

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



Estudo dos genes *AXIN2*, *BMPR1A* e
MGMT na susceptibilidade para o
desenvolvimento de polipose serreada

Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em
Saúde

Melissa Mendes da Rocha

Fevereiro, 2013

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



Estudo dos genes *AXIN2*, *BMPR1A* e *MGMT* na susceptibilidade para o desenvolvimento de polipose serreada

Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em
Saúde

Melissa Mendes da Rocha

Orientadora: Dr.^a Cristina Albuquerque

Fevereiro, 2013

Em memória da minha avó Lurdes

Agradecimentos

Deixo aqui o meu mais profundo agradecimento a todos aqueles, que de uma forma ou de outra, me ajudaram na concretização deste trabalho.

Agradeço em primeiro lugar à Dr.^a Cristina Albuquerque, por toda a orientação dada neste projecto, por todos os conhecimentos que me transmitiu e pelo incansável apoio e incentivo que me deu, sempre com grande simpatia e amizade.

À Dr.^a Patrícia Silva, um grande agradecimento, por toda a sua ajuda e disponibilidade para me responder a questões, sempre com muita paciência.

À Mestre Inês Francisco e ao Dr. Bruno Filipe, pela transmissão de conhecimentos, pela disponibilidade e por toda a ajuda que me deram.

À Dr.^a Sofia Fragoso, Dr.^a Patrícia Machado, Dr.^a Sidónia Santos e Mestre Sofia Gouveia por todo o incentivo, troca de ideias, amizade e boa disposição.

Ao Serviço de Gastreenterologia, Clínica de risco familiar e ao Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E., pela disponibilidade do material biológico e pela informação clínica relativa aos doentes.

À Doutora Branca Cavaco, Coordenadora da Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular, do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E., por ter autorizado a realização deste estudo nas suas instalações.

À mestranda Catarina Pereira pela companhia, amizade e apoio que me deu nos tempos mais difíceis.

Aos restantes membros da Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular, pela simpatia com que me receberam.

À Professora Doutora Alexandra Maia e Silva pela permissão da realização deste trabalho, por todo o apoio e disponibilidade.

Aos meus amigos Bárbara Gonçalves, Miguel Afonso, Vânia Mendes, Sara Condinho, Márcia Santos e Sara Lopes, pela amizade e por todo o apoio dado.

Um agradecimento especial à minha amiga Joana Nunes, por todo o incentivo, por me ouvir quando mais precisei, por todos os conselhos e, pela grande amizade.

Por fim, mas não menos importantes, deixo aqui o meu mais profundo e sincero agradecimento aos meus pais e irmão, simplesmente por tudo. Por todo o amor incondicional, apoio e carinho que me dão, e por me incentivarem sempre a alcançar os meus sonhos e objectivos, sem nunca desistir.

Resumo

A polipose serreada (PS) é uma doença rara caracterizada pela presença de pólipos no cólon, com uma histologia serreada (pólipos serreados) e associada a risco aumentado de desenvolvimento de cancro do cólon e recto (CCR). No entanto, as causas moleculares envolvidas na susceptibilidade para esta doença não são ainda conhecidas.

Este trabalho teve como objectivo o estudo de genes candidatos para susceptibilidade para a PS – *AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*, de forma a identificar causas moleculares que possam ser responsáveis por esta síndrome. Com o estudo destes genes, pretendeu-se também contribuir para a caracterização das vias de tumorigénese envolvidas no mesmo. Com esta finalidade, foi efectuada a pesquisa de mutações germinais nestes genes em 12 indivíduos com PS. Para o *BMPRIA* foram ainda analisados 2 indivíduos com polipose juvenil. Foi também realizada a análise de perda de heterozigotia (LOH) do locus do gene *MGMT* em 47 lesões (pólipos serreados e adenomas tradicionais) de doentes com PS.

Foram identificadas 21 mutações germinais: 14 no gene *AXIN2*, 5 no gene *BMPRIA* e 2 no gene *MGMT*. A análise *in silico*, utilizando os *softwares* *SIFT*, *Polyphen*, *Human Splicing Finder*, *ESE Finder* e *Variant Effect Predictor (Ensembl)*, em alguns casos, conjugada com a análise de segregação da mutação com a doença nos familiares, permitiu a identificação de 5 mutações como possivelmente patogénicas: 2 no *AXIN2* (c.1889G>A e c.2013_2024del12) e 3 no *BMPRIA* (c.430+1G>A, c.431-26T>A e c.676-6A>C), duas delas nos dois doentes com polipose juvenil. Foi detectada LOH do *MGMT* em 13/47 (28%) lesões de PS, sendo que todas apresentavam localização preferencial no cólon proximal/todo o cólon e 9 possuíam também metilação do gene *MGMT*.

Em conclusão, não se pode excluir o envolvimento dos três genes estudados na susceptibilidade para a PS, sendo necessários estudos adicionais para confirmar a patogenicidade das mutações detectadas. Adicionalmente, para além da metilação do gene *MGMT*, verificou-se que a LOH é também um evento precoce que contribui para a iniciação tumoral no contexto de PS.

Palavras-chave: polipose serreada; genes de susceptibilidade para polipose serreada; perda de heterozigotia; metilação do *MGMT*

Abstract

Serrated polyposis (SP) is a rare disease characterized by the presence of polyps in the colon, with a serrated histology (serrated polyps) and it is associated with increased risk of developing colorectal cancer (CRC). However, the molecular causes involved in the susceptibility to this disease are not yet known.

The aim of this work was to study candidate genes to susceptibility to SP - *AXIN2*, *BMPRIA* and *MGMT* in order to identify molecular causes that may be responsible for this syndrome. By studying these genes was also intended to contribute to the characterization of pathways involved in tumorigenesis of this disease. For this purpose, it was searched for germline mutations in these genes, in 12 individuals with SP. For *BMPRIA* were also analyzed two individuals with juvenile polyposis. It was also performed the analysis of loss of heterozygosity (LOH) of the *MGMT* gene locus in 47 lesions (serrated polyps and traditional adenomas) of patients with SP.

21 germline mutations have been identified: 14 in *AXIN2* gene, 5 in *BMPRIA* gene and 2 in *MGMT* gene. *In silico* analysis, by using the software *SIFT*, *Polyphen*, *Human Splicing Finder*, *ESE Finder* and *Variant Effect Predictor (Ensembl)*, in some cases together with the segregation analysis of the mutation in family members with the disease, allowed the identification of 5 mutations as potentially pathogenic: 2 in *AXIN2* (c.1889G>A and c.2013_2024del12) and 3 in *BMPRIA* (c.430+1G>A, c.431-26T>A and c.676-6A> C), 2 of which, detected in two patients with juvenile polyposis. It was detected LOH in the *MGMT* gene in 13/47 (28%) lesions of SP, all of which showed preferential localization in the proximal colon/entire colon, and 9 also had *MGMT* gene methylation.

In conclusion, it cannot be excluded the involvement of all three genes studied in susceptibility to SP, and additional studies are needed to confirm the pathogenic mutations detected. Furthermore, in addition to methylation of *MGMT* gene, it was found that LOH is also an early event that contributes to tumor initiation in the context of SP.

Key-words: serrated polyposis; serrated polyposis susceptibility genes; loss of heterozygosity; *MGMT* gene methylation

Índice Geral

Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas	10
Índice de Anexos	12
Lista de Abreviaturas	13
1. Introdução.....	16
1.1. Cancro do cólon e recto.....	16
1.1.1. Sequência adenoma-carcinoma.....	16
1.1.2. Via de transdução de sinal WNT/ β -catenina	18
1.2. Síndromes hereditários de CCR.....	19
1.2.1. Cancro do cólon e recto hereditário não associado a polipose	20
1.2.2. Síndromes associados a polipose.....	22
1.2.2.1. Polipose serreada	23
1.2.3. Vias de tumorigénese associadas a polipose serreada	25
1.2.3.1. Via serreada	26
1.2.3.2. Via alternativa	30
1.2.4. Polipose serreada com história familiar de pólipos e/ou CCR	30
1.3. Genes candidatos para susceptibilidade para a polipose serreada	31
1.3.1. <i>AXIN2</i>	31
1.3.2. <i>BMPRI1A</i>	33
1.3.3. <i>MGMT</i>	35
2. Objectivos.....	38
3. Procedimento experimental	39
3.1. Material biológico	39
3.2. Métodos.....	39
3.2.1. Extracção de DNA genómico a partir de sangue periférico	39
3.2.2. Extracção de DNA genómico a partir de tecido incluído em parafina	40
3.2.3. Extracção de RNA a partir de sangue periférico	40

3.2.4.	Análise de mutações germinais nos genes <i>AXIN2</i> , <i>BMPRIA</i> e <i>MGMT</i> ..	40
3.2.4.1.	Reacção em cadeia da polimerase (PCR)	40
3.2.4.2.	Optimização das reacções de PCR	41
3.2.4.3.	Amplificação por PCR dos vários exões dos genes <i>AXIN2</i> , <i>BMPRIA</i> e <i>MGMT</i>	41
3.2.4.4.	Controlo da eficiência dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose	42
3.2.4.5.	Reacção de transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR)	43
3.2.4.6.	Purificação dos produtos amplificados por PCR	44
3.2.4.7.	Sequenciação automática	45
3.2.4.7.1.	Reacção de sequenciação	45
3.2.4.7.2.	Precipitação e purificação do produto da reacção de sequenciação	46
3.2.4.7.3.	Preparação das amostras para sequenciação automática	46
3.2.4.7.4.	Análise de resultados	47
3.2.4.7.5.	Análise <i>in silico</i> das mutações germinais identificadas	47
3.2.5.	Análise de perda de heterozigotia (LOH) do gene <i>MGMT</i>	48
3.2.5.1.	Amplificação do DNA para análise de LOH do gene <i>MGMT</i>	48
3.2.5.2.	Preparação das amostras para análise pelo <i>software GeneScan</i> ...	49
3.2.5.3.	Análise de resultados	50
4.	Resultados	51
4.1.	Análise de mutações germinais nos genes <i>AXIN2</i> , <i>BMPRIA</i> e <i>MGMT</i>	51
4.1.1.	<i>AXIN2</i>	51
4.1.2.	<i>BMPRIA</i>	58
4.1.3.	<i>MGMT</i>	62
4.2.	Análise de perda de heterozigotia do gene <i>MGMT</i>	64
5.	Discussão	67

6.	Conclusão	76
7.	Referências Bibliográficas.....	78
8.	Anexos.....	84

Índice de Figuras

Figura 1 – Sequência adenoma-carcinoma	17
Figura 2 – Via WNT- β -catenina	19
Figura 3 – Síndromes hereditários de CCR	20
Figura 4 – Representação esquemática do cólon e recto	22
Figura 5 – Tipos de pólipos serrados	24
Figura 6 – Modelo de tumorigênese colorectal	26
Figura 7 – Via RAS-RAF-MEK-ERK.....	27
Figura 8 – Iniciação tumoral – via serrada.....	29
Figura 9 – Localização do gene <i>AXIN2</i> no cromossoma 17 humano	32
Figura 10 – Representação esquemática da proteína AXIN2	32
Figura 11 – Localização do gene <i>BMPRI1A</i> no cromossoma 10 humano	34
Figura 12 – Representação esquemática da proteína BMPRI1A.....	34
Figura 13 – Via de sinalização BMP	35
Figura 14 – Localização do gene <i>MGMT</i> no cromossoma 10 humano	36
Figura 15 – Representação esquemática da proteína MGMT.....	36
Figura 16 – Reparação dos aductos O ⁶ -Metilguanina pela MGMT	37
Figura 17 – Exemplo de uma mutação <i>missense</i> (c.430+1 G>A); sequência <i>reverse</i> da amostra A1548	58
Figura 18 – Resultado obtido através da amplificação do cDNA compreendendo um fragmento de 2138 pb entre os exões 1 e 11, para a amostra A1548.....	60
Figura 19 – Electroforectograma representativo de uma amostra tumoral que apresenta perda de heterozigotia (LOH) para o marcador D10S1651	64
Figura 20 – Electroforectograma representativo de uma amostra homozigótica para o marcador D10S169	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Critérios de Amesterdão II.....	21
Tabela 2 – Critérios clínicos da polipose serrada	25
Tabela 3 – Programa (SEQ) utilizado na amplificação por PCR dos fragmentos de cada gene estudado	42
Tabela 4 – Programa de RT-PCR utilizado na síntese de cDNA num termociclador <i>Veriti (Applied Biosystems)</i>	44
Tabela 5 – Programa utilizado na purificação do produto amplificado por PCR no termociclador <i>Biometra (Alfagene)</i>	45
Tabela 6 – Programa (SEQAUTO) utilizado para a reacção de sequenciação num termociclador <i>Veriti (Applied Biosystems)</i>	46
Tabela 7 – Identificação das sequências nucleotídicas de referência para cada gene analisado	47
Tabela 8 – Programa (RER) de PCR usado na amplificação dos marcadores de microssatélites num termociclador <i>Veriti (Applied Biosystems)</i> com reagentes <i>Bioline</i>	49
Tabela 9 – Programa (RER GOLD-PLAT) de PCR usado na amplificação dos marcadores de microssatélites num termociclador <i>Veriti (Applied Biosystems)</i> com reagentes <i>Roche</i>	49
Tabela 10 – Identificação das mutações germinais detectadas no gene <i>AXIN2</i> e respectiva frequência	51
Tabela 11 – Identificação e frequência alélica das variantes detectadas no gene <i>AXIN2</i> de acordo com a base de dados NCBI	52
Tabela 12 – Resultados da análise <i>in silico</i> da consequência prevista das mutações germinais encontradas no gene <i>AXIN2</i>	54
Tabela 13 – Resultados da pesquisa de mutações germinais no gene <i>AXIN2</i> nas amostras de DNA de sangue periférico dos familiares dos casos <i>proband</i> que se revelaram homozigóticos para todas as variantes.....	57
Tabela 14 – Mutações germinais detectadas no gene <i>BMPRIA</i>	58
Tabela 15 – Identificação e frequência alélica das variantes detectadas no gene <i>BMPRIA</i> de acordo com a base de dados NCBI	59
Tabela 16 – Resultados da análise <i>in silico</i> da consequência prevista das mutações germinais no gene <i>BMPRIA</i>	61

Tabela 17 – Identificação das mutações detectadas no gene <i>MGMT</i> e respectiva frequência nas amostras analisadas.....	62
Tabela 18 – Identificação e frequência alélica das variantes detectadas no gene <i>MGMT</i> de acordo com a base de dados NCBI.....	62
Tabela 19 – Resultados da pesquisa de mutações germinais no exão 3 do gene <i>MGMT</i> nas amostras dos familiares da família PH4	63
Tabela 20 – Resultados da análise de perda de heterozigotia (LOH) no gene <i>MGMT</i>	64
Tabela 21 – Resultados dos estudos de instabilidade de microssatélites e metilação do gene <i>MGMT</i> juntamente com resultados da análise de LOH neste gene.....	73

Índice de Anexos

Anexo 1 – Tabela com características clínicas dos doentes com PS	85
Anexo 2 – Protocolo de extracção de RNA a partir de sangue periférico com Trizol [®]	86
Anexo 3 – Sequências e características dos <i>primers</i> desenhados para os genes em estudo	88
Anexo 4 – Condições utilizadas na amplificação por PCR dos genes em estudo	91
Anexo 5 – Protocolos para preparação dos reagentes utilizados no controlo da eficiência dos produtos de PCR	92
Anexo 6 – Condições utilizadas na amplificação por PCR do gene <i>BMPRIA</i> , a partir do cDNA	94
Anexo 7 – Protocolo de purificação e extracção de DNA a partir de banda de gel de agarose – <i>QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)</i>	95
Anexo 8 – Protocolo de precipitação e purificação do DNA Etanol / EDTA / Acetato de sódio – <i>BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)</i> após a reacção de sequenciação	96
Anexo 9 – Marcadores de microssatélites	97
Anexo 10 – Resultados da pesquisa de mutações germinais nos exões e respectivas regiões flanqueadoras do gene <i>AXIN2</i>	98
Anexo 11 – Características dos familiares dos <i>proband</i> analisados	99
Anexo 12 – Resultados da pesquisa de mutações germinais no gene <i>BMPRIA</i> (exceptuando o exão 11)	100
Anexo 13 – Resultados da pesquisa de mutações germinais no gene <i>MGMT</i> (exceptuando os exões 1 e 5A)	101

Lista de Abreviaturas

APC – adenomatous polyposis coli

APAF – Polipose adenomatosa familiar atenuada

ASS – Adenoma serreado sésil

AST – Adenoma serreado tradicional

ATV – Adenoma tubuloviloso

AXIN2 – Axis inhibition protein 2

BMPRI1A – bone morphogenic protein receptor 1A

BMP – *bone morphogenic protein*

BRAF – V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CA – Critérios de Amesterdão

CCR – Cancro do cólon e recto

cDNA – DNA complementar

CIMP – Fenótipo metilador das ilhas CpG

CIMP-H – Fenótipo metilador das ilhas CpG de alto grau

CIMP-L – Fenótipo metilador das ilhas CpG de baixo grau

CIN – Instabilidade cromossómica

DCC – Deleted in colorectal carcinoma

ddNTPs – Didesoxirribonucleótidos

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNMT – Enzimas DNA metiltransferases

dNTPs – Desoxirribonucleótidos

DTT – Ditionitrito

Dsh – *Dishevelled*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FCCTX – Cancro do cólon e recto familiar do tipo X

G6PD – Glucose-6-fosfato desidrogenase

GSK-3 – *glycogen synthase kinase-3 β*

HNPCC – Cancro do cólon e recto hereditário não associado a polipose

IGFBP7 – *Insulin-like growth factor binding protein 7*

IPOLFG, E.P.E. – Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil

KRAS – *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LOH – Perda de heterozigotia

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MGMT – *O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase*

MLH1 – Homólogo 1 do mutL, cancro do cólon não associado a polipose, tipo 2 (*E. coli*)

MMR – *Mismatch repair*

mRNA – RNA mensageiro

MS-MPLA – (*Methylation specific – multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MSH2 – Homólogo 2 do mutS, cancro do cólon não associado a polipose, tipo 1 (*E. coli*)

MSH6 – Homólogo do mutS 6 (*E. coli*)

MSI – Instabilidade de microssatélites

MSI-H – Instabilidade de microssatélites de alto grau

MSI-L – Instabilidade de microssatélites de baixo grau

MSS – Estabilidade de microssatélites

MUTYH – Homólogo do mutY (*E. coli*)

%(p/v) – percentagem expressa em peso por volume

pb – pares de base

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PAM – Polipose adenomatosa associada ao gene *MUTYH*

PCR – Reacção da polimerase em cadeia

PH – Pólipo hiperplásico

PM – Pólipo misto serreado

PMS2 – Postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)

PP2Ac – protein phosphatase 2, subunit c

RNA – Ácido ribonucleico

RT – transcrição reversa

SMAD 2 – Mothers against decapentaplegic homolog 2

SMAD 4 – Mothers against decapentaplegic homolog 4

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

TGFβ – *Transforming growth factor, beta*

TP53 – *Tumor protein p53*

1. Introdução

1.1. Cancro do cólon e recto

O cancro do cólon e recto (CCR) é o quarto cancro mais frequente e o terceiro mais mortal a nível mundial (World Health Organization, 2012); sendo o terceiro cancro mais comum em homens e o segundo mais frequente em mulheres (Ferlay et al., 2010). Apresenta uma elevada morbilidade e mortalidade a nível global, tendo maior incidência em países desenvolvidos (Moghaddam et al., 2007). Estima-se que, em 2008, tenham ocorrido mais de 1,2 milhões de novos casos e 608 700 mortes provocadas por esta doença, em todo o mundo (Jemal et al., 2011). No que diz respeito às suas características, é um tipo de cancro bastante heterogéneo, uma vez que comporta perfis moleculares, características clinico-patológicas e vias de progressão diferentes (Zambirinis et al., 2009).

O CCR tem uma etiologia multifactorial, que envolve factores ambientais (como por exemplo: a dieta – nomeadamente o elevado consumo de carnes vermelhas, a ingestão de álcool e o tabagismo, que são factores de risco elevado para o desenvolvimento desta neoplasia), e factores genéticos (como a predisposição genética, nomeadamente a presença de história familiar de CCR) (Potter, 1999; Gonzalez, 2007; Moghaddam et al., 2007).

O CCR pode ser esporádico ou familiar, sendo que aproximadamente 70% são casos esporádicos, que surgem por acumulação de mutações somáticas; e 25-30% estão associados a formas familiares da doença (Zambirinis et al., 2009; Jaspersen et al., 2010). Dentro das formas familiares, 5% desses casos estão associados a síndromes que apresentam mutações em genes de elevada penetrância, muito bem caracterizados, enquanto que os restantes 25% correspondem a mutações em genes ainda desconhecidos, provavelmente na sua maioria genes de baixa penetrância, alguns ainda não caracterizados e que podem interagir com factores ambientais, conduzindo à iniciação e progressão tumoral (Zambirinis et al., 2009).

1.1.1. Sequência adenoma-carcinoma

O CCR desenvolve-se através de uma série de eventos genéticos, que conduzem à transformação do epitélio cólico normal num adenoma culminando em adenocarcinoma, na chamada sequência “adenoma-carcinoma” (Pino e Chung, 2010). Estão descritas três vias principais de alterações genéticas distintas que

conduzem à tumorigénese: a via da instabilidade cromossómica (CIN), a da instabilidade de microssatélites (MSI) e a do fenótipo metilador das ilhas de CpG (CIMP), sendo que a maioria dos casos de CCR (80%) derivam da via CIN, ou via supressora, à qual está associada a sequência adenoma-carcinoma (Pino e Chung, 2010).

A via CIN foi inicialmente proposta em 1990 por Fearon e Vogelstein. Estes autores propuseram um modelo no qual elucidaram as alterações genéticas essenciais, necessárias para o desenvolvimento de CCR através desta via. Estas consistem na acumulação de alterações genéticas (por exemplo: mutações pontuais) e epigenéticas (por exemplo: metilação do DNA) em múltiplos genes (genes supressores tumorais e oncogenes) que regulam o crescimento e diferenciação celular. Todas estas alterações conferem vantagem selectiva de expansão clonal à célula mutada (Armaghany et al., 2012). A este modelo dá-se o nome de sequência adenoma-carcinoma (Figura 1).

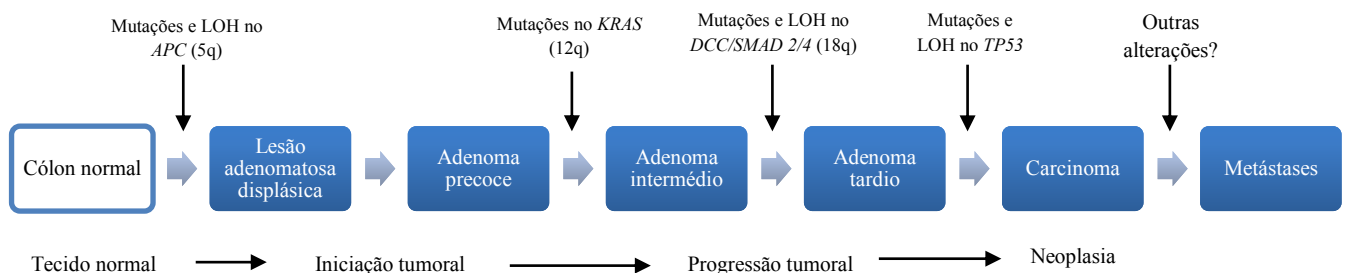


Figura 1 – Sequência adenoma-carcinoma (adaptado de Fearon e Vogelstein, 1990); Legenda: LOH – perda de heterozigotia (*loss of heterozygosity*).

Neste modelo, a inactivação do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*) (5q21-22), um gene supressor tumoral, leva à formação de um adenoma a partir da mucosa cólica normal, iniciando deste modo a tumorigénese. Este gene codifica para uma proteína com o mesmo nome, com múltiplos domínios funcionais, que regula a diferenciação, adesão, polaridade celular, migração, desenvolvimento, apoptose celular, e a segregação dos cromossomas. No entanto, o seu papel principal como gene supressor de tumor é o da regulação negativa dos níveis intracelulares de β -catenina, na via de transdução de sinal WNT/ β -catenina (Pino e Chung, 2010). Em seguida, ocorrem mutações no oncogene *KRAS* (12p12.1), as quais são responsáveis

pela progressão dos adenomas (Pino e Chung, 2010; Boland e Goel, 2010), sendo que este gene se encontra mutado em cerca de 30-50% de todos os CCR (Pino e Chung, 2010).

A ocorrência de alterações genéticas (nomeadamente deleções e perda de heterozigotia (LOH)) em genes existentes no cromossoma 18q, promove a progressão e transformação maligna dos adenomas. Estas alterações ocorrem principalmente em genes da via de sinalização TGF- β (*Transforming growth factor* β), nomeadamente os genes *SMAD2* (*mothers against decapentaplegic homolog 2*) e *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*). Também a inactivação do gene supressor de tumor *DCC* (18q21.3) contribui para a progressão tumoral dos adenomas (Pino e Chung, 2010; Boland e Goel, 2010).

Por último, a transição de adenoma tardio para carcinoma, é mediada pela perda bi-alélica ou inactivação do gene supressor tumoral *TP53* (17q13.1) (Boland e Goel, 2010). O produto deste gene (p53) é um factor de transcrição que controla a transcrição de genes envolvidos no metabolismo do DNA, apoptose, regulação do ciclo celular, senescência, angiogénese, resposta imunitária, diferenciação e migração celular. Quando este gene é inactivado, provoca uma proliferação descontrolada das células tumorais do epitélio cólico (Pino e Chung, 2010; Armaghany et al., 2012).

1.1.2. Via de transdução de sinal WNT/ β -catenina

A via WNT/ β -catenina tem um papel importante no desenvolvimento dos órgãos, na embriogénese e na homeostasia celular. Esta via tem como principal função a regulação dos níveis intracelulares de β -catenina. A via é activada quando recebe um sinal externo: a proteína WNT liga-se ao seu receptor, um membro da família *Frizzled*. Este receptor envia um sinal a diversas proteínas intracelulares para a formação de um complexo, com as proteínas Dsh (*Dishevelled*), GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3 β*), AXIN e APC (*adenomatous polyposis coli*). A Dsh é uma fosfoproteína citoplasmática que, quando está activa inibe a actividade da GSK-3, impedindo a fosforilação da β -catenina. Quando a β -catenina não está fosforilada não é degradada, pelo que se acumula no citoplasma. Deste modo, a β -catenina fica disponível para ser translocada para o núcleo, onde se liga a proteínas LEF/TCF (*lymphocyte enhancer binding factor/T-cell factor*) que actuam como factores de

transcrição, regulando a expressão de genes alvo da via WNT (Logan e Nusse, 2004).

Na ausência de activação da via, a β -catenina é fosforilada, pelo complexo proteico de degradação (Figura 2) do qual fazem parte as proteínas AXIN, APC e GSK3 (Centelles, 2012). A β -catenina fosforilada é então reconhecida pela ubiquitina, sendo degradada no proteossoma. Deste modo, os níveis citoplasmáticos de β -catenina são baixos, pelo que não há translocação para o núcleo e não há activação dos genes alvo.

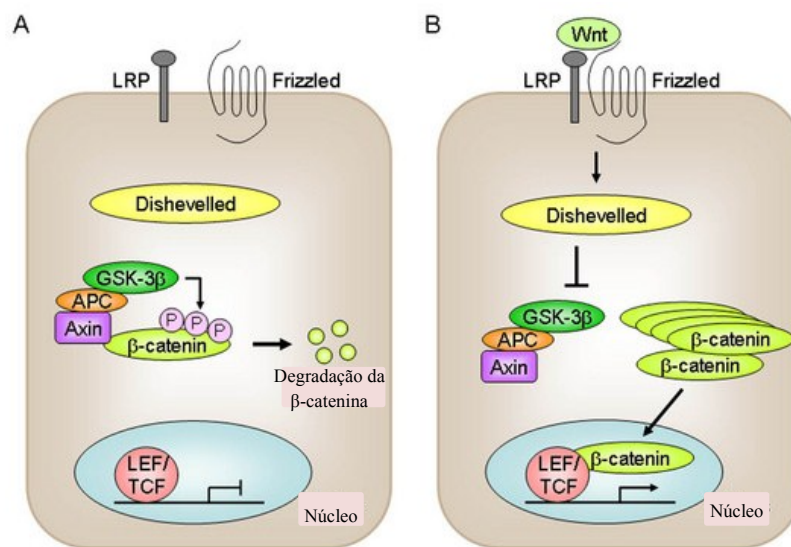


Figura 2 – Via WNT- β -catenina; A – via inativa, B – via activa; Retirado de: Osakada et al., *J Neurosci*, 2007

Uma outra forma de activação desta via é através da presença de mutações em genes desta via, que provocam a sua activação constitutiva. Assim, as mutações que activam a via impedem a degradação da β -catenina pelo proteossoma, aumentando a sua concentração plasmática e, conseqüentemente, a sua translocação para o núcleo, aumentando a transcrição dos genes alvo da via WNT, o que conduz ao desenvolvimento tumoral. De facto, a maioria dos tumores colorectais apresentam mutações em genes específicos da via WNT/ β -catenina (Albuquerque et al., 2010; 2011).

1.2. Síndromes hereditárias de CCR

Os síndromes hereditários de CCR são definidos consoante as suas características clínicas, patológicas e, mais recentemente, pelas suas características genéticas.

Apesar de poder haver algumas semelhanças a nível clínico, cada síndrome tem riscos distintos de desenvolvimento tumoral, assim como características clínicas e etiologias genéticas específicas (Jasperson et al., 2010). Em geral, nestes síndromes, o CCR desenvolve-se em indivíduos com idade inferior a 50 anos, e apresenta um padrão de transmissão autossómica dominante ou recessiva. Pelo contrário, os casos esporádicos, que são mais frequentes, ocorrem em pessoas com idade superior a 70 anos, sem qualquer história familiar de neoplasia.

Os síndromes hereditários de CCR, podem ser divididos em duas categorias: os síndromes de CCR não associados a polipose (HNPCC) e os síndromes associados a polipose (Figura 3).

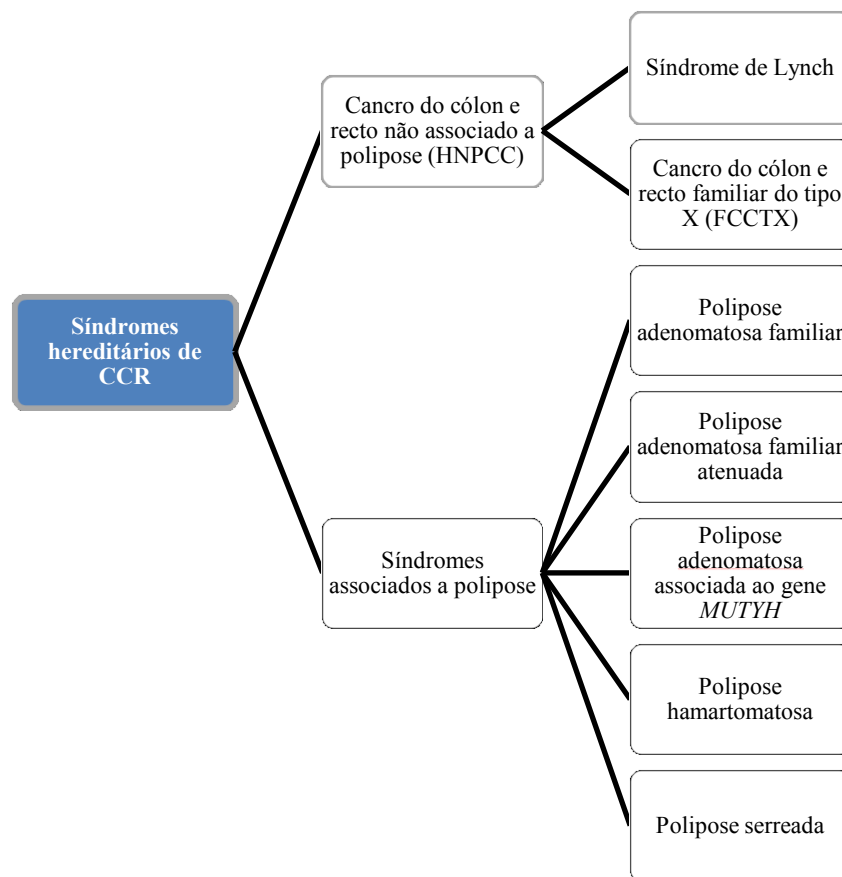


Figura 3 – Síndromes hereditárias de CCR (Adaptado de Lindor et al., 2005)

1.2.1. Cancro do cólon e recto hereditário não associado a polipose

O termo HNPCC (cancro do cólon e recto hereditário não associado a polipose) é utilizado para designar o cancro do cólon e recto familiar que se desenvolve na presença de poucos pólipos (Jass, 2006). O HNPCC é definido a nível

clínico pelo preenchimento de todos os critérios de Amesterdão (Tabela 1). Dentro do grupo de HNPCC distinguem-se o síndrome de Lynch e o cancro do cólon e recto familiar do tipo X (FCCTX). O síndrome de Lynch representa 2%-4% de todos os CCR e define-se pela presença de mutações germinais em genes do sistema de reparação de erros no DNA do tipo *mismatch* (MMR) – nomeadamente nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Os tumores que se desenvolvem no contexto de síndrome de Lynch são caracterizados pela presença de instabilidade de microssatélites (MSI) que resulta da deficiência no sistema de reparação de erros no DNA do tipo *mismatch*. As famílias que preenchem os critérios de Amesterdão (CA) mas que não possuem mutações germinais nos genes MMR e cujos tumores não apresentam MSI são designadas por FCCTX (Lynch et al., 2006; Lindor, 2009).

Tabela 1 - Critérios de Amesterdão II (Jass, 2006)

-
- Três ou mais familiares afectados com CCR ou tumores extra-cólicos do espectro do síndrome de Lynch (endométrio, ovário, estômago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, tracto urinário, cérebro e pele), sendo um deles parente em 1º grau dos outros dois.
 - Pelo menos duas gerações afectadas com CCR.
 - Pelo menos um indivíduo com CCR, diagnosticado antes dos 50 anos.
 - Exclusão do síndrome de polipose adenomatosa familiar (PAF).
-

No caso do síndrome de Lynch, os tumores seguem a via da instabilidade de microssatélites (MSI), ou via mutadora, e não a via CIN.

A via MSI para além de ser característica da grande maioria dos tumores de síndrome de Lynch, está presente em cerca de 12% dos casos de CCR esporádico (Boland e Goel, 2010). A MSI é uma consequência da deficiência na reparação de erros no DNA, causada por mutações germinais nos genes do sistema MMR, que conduzem à inactivação destes mesmos genes. Um sistema MMR ineficaz leva a uma incapacidade de reparação de emparelhamentos errados, inserções e deleções de nucleótidos, resultantes de erros originados pela DNA polimerase, que ocorrem durante a replicação do DNA (Umar et al., 2004). Os microssatélites são unidades repetitivas de DNA (geralmente conjuntos de 1 a 6 pares de base, que se repetem várias vezes), distribuídos ao longo de todo o genoma, principalmente em regiões não codificantes. O mecanismo de replicação do DNA tem tendência a cometer mais erros em regiões de sequências repetitivas, de maneira que os microssatélites

acumulam mutações nas células que têm o sistema MMR ineficaz, resultando em MSI. A alteração do comprimento das sequências microssatélite no DNA do tumor, em comparação com o DNA de mucosa cólica normal, é classificada como MSI (Umar et al., 2004; Boland e Goel, 2010). Os tumores que não apresentam MSI são designados como sendo MSS (microssatélites estáveis).

1.2.2. Síndromes associados a polipose

No grupo dos síndromes associados a polipose, os mais frequentes são os síndromes associados à polipose adenomatosa. Dentro deste grupo encontram-se: a polipose adenomatosa familiar clássica (PAF), a PAF atenuada (APAF) e a polipose adenomatosa associada ao gene *MUTYH* (PAM).

A PAF caracteriza-se clinicamente pela presença de centenas a milhares de pólipos adenomatosos distribuídos por todo o cólon (Figura 4) e por um risco aumentado de desenvolvimento de cancro que será máximo por volta da 4ª década de vida caso os pólipos não sejam removidos. Este síndrome está associado à ocorrência de mutações germinais no gene *APC* e apresenta um padrão de transmissão autossómico dominante.

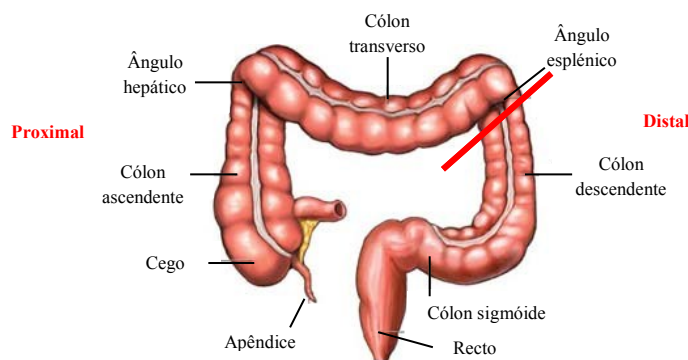


Figura 4 – Representação esquemática do cólon e recto; Adaptado de: <http://www.houstoncolon.com/laparoscopic-surgery/laparoscopic-faqs/>; O cólon pode ser classificado em cólon proximal ou cólon distal. O cólon proximal engloba o cego, o cólon ascendente e o cólon transversal (à direita do ângulo esplênico); e o cólon distal engloba o cólon descendente, sigmóide e recto (à esquerda do ângulo esplênico).

A APAF é uma forma menos severa da PAF, que se caracteriza clinicamente pela presença de 10-99 adenomas no cólon e risco aumentado de CCR, apesar de

desenvolvimento mais tardio que na PAF. Se o diagnóstico molecular for positivo para mutações germinais no gene *APC* (em cerca de 40% dos casos), esta tem uma transmissão autossômica dominante, mas se por outro lado, a pesquisa de mutações germinais for positiva para o gene *MUTYH* (em cerca de 30% dos casos), esta é designada por PAM, apresentando mutações bi-alélicas neste gene e tendo uma transmissão autossômica recessiva (Jasperson et al., 2010).

Na polipose hamartomatosa, as lesões precursoras são os pólipos hamartomatosos, apresentando um risco elevado de desenvolvimento de CCR e outros tipos de tumores. Fazem parte da polipose hamartomatosa, o síndrome de Peutz-Jeghers (caracterizado pelo desenvolvimento de múltiplos pólipos hamartomatosos no tracto gastrointestinal, lesões cutâneas nos lábios e mucosa oral e risco aumentado de CCR, resultante de mutações no gene *STK11 (LKB1)*) e o síndrome de polipose juvenil (síndrome autossômica dominante raro, caracterizado pelo desenvolvimento de pelo menos 3 pólipos juvenis no cólon e com um risco aumentado de CCR, que se encontra associado a mutações no gene *BMPRIA* ou no gene *SMAD4*) (Jasperson et al., 2010).

Outro síndrome associado a polipose, é a polipose serreada. Esta caracteriza-se pela presença de pólipos distintos dos pólipos adenomatosos, com uma histologia serreada, os quais se denominam pólipos serreados. No entanto, a causa molecular que predispõe para esta doença não é ainda conhecida (Figura 3) (Leggett e Whitehall, 2010).

1.2.2.1. Polipose serreada

Existem diversos tipos de pólipos serreados, constituindo um grupo heterogêneo de pólipos no cólon. Os pólipos serreados incluem: pólipos hiperplásicos (PH), adenomas serreados sésseis (ASS), adenomas serreados tradicionais (AST) e os pólipos mistos serreados (PM) (Figura 5) (Snover et al., 2005; Leggett e Whitehall, 2010; Sugumar e Sinicrope, 2010). A característica comum a todos estes pólipos serreados é a sua histologia de aparência serreada (semelhante a dentes de serra) envolvendo as criptas do epitélio do cólon (Leggett e Whitehall, 2010). Histologicamente, os PH caracterizam-se por criptas alongadas, com uma arquitetura serreada na parte superior das mesmas, não exibindo displasia. Os ASS apresentam proliferação e arquitetura atípica, e podem apresentar ou não

displasia, enquanto os AST são pólipos displásicos que apresentam uma serreação proeminente (Leggett e Whitehall, 2010; Snover, 2011).

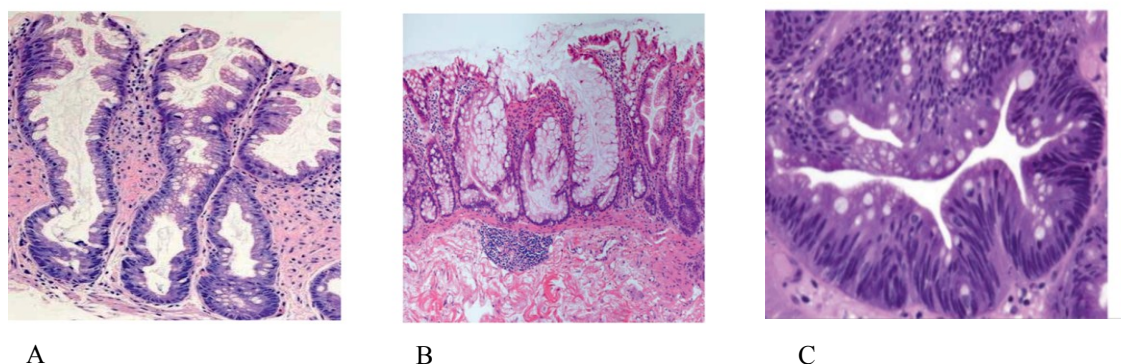


Figura 5 – Tipos de pólipos serrados; Retirado de: Sugumar, et al.; *F1000 Med. Rep.*, 2010; (A – PH; B – ASS; C – AST)

Em 1980, Williams et al. (Torlakovic e Snover, 1996) descreveram pela primeira vez a polipose hiperplásica, que caracterizaram pela presença de múltiplos pólipos hiperplásicos, no entanto, sem aparente potencial carcinogénico. Foi apenas em 1996, que Torlakovic e Snover (Torlakovic e Snover, 1996) constataram que este síndrome (em particular, quando existem adenomas serrados) parecia estar associado ao desenvolvimento de CCR.

Assim, a polipose hiperplásica, foi definida pela primeira vez em 2000 por Jass e Burt, na WHO. Entretanto, em 2010, Snover et al., WHO, fizeram uma revisão à definição (Tabela 2), na qual foi adoptada para a polipose hiperplásica a designação abrangente de polipose serrada (PS) uma vez que, actualmente, é reconhecido que as lesões previamente classificadas como hiperplásicas, representam um grupo heterogéneo de pólipos que incluem, também, os ASS e os AST e não apenas PH (Noffsinger, 2009). Definição de PS baseia-se assim no preenchimento de pelo menos um dos critérios apresentados na tabela 2.

A PS é então uma condição rara, caracterizada a nível clínico pela presença de múltiplos pólipos serrados no cólon, os quais apresentam uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de CCR (Jasperson et al., 2010).

Tabela 2 – Critérios clínicos para a classificação de polipose serrada (WHO – Snover et al., 2010)

Critérios clínicos	
	• Presença de pelo menos 5 pólipos serrados, à direita do cólon sigmóide, em que pelo menos dois apresentam um diâmetro superior a 10 mm.
	• Qualquer número de pólipos serrados à direita do cólon sigmóide em indivíduos com pelo menos um familiar em 1º grau afectado com polipose serrada.
	• Presença de mais de 20 pólipos serrados de qualquer tamanho, distribuídos por todo o cólon.

1.2.3. Vias de tumorigénese associadas a polipose serrada

Recentemente, estudos que examinaram as alterações moleculares em pólipos serrados e carcinomas serrados, têm demonstrado a existência de alterações genéticas diferentes das que são observadas na via CIN. Por exemplo, mutações e perda de heterozigotia nos genes *APC* e *TP53*, ocorrem raramente, enquanto que alterações em sequências de microssatélites e hipermetilação das ilhas CpG (regiões abundantes em dinucleótidos CG - combinação de pares de nucleótidos citosina e guanina, existentes nos promotores de alguns genes), são mais comuns (Noffsinger, 2009; Leggett e Whitehall, 2010).

Assim, têm surgido evidências da existência de outras vias de tumorigénese, que tentam explicar o desenvolvimento de PS, nomeadamente: a via serrada e a via alternativa (Figura 6).

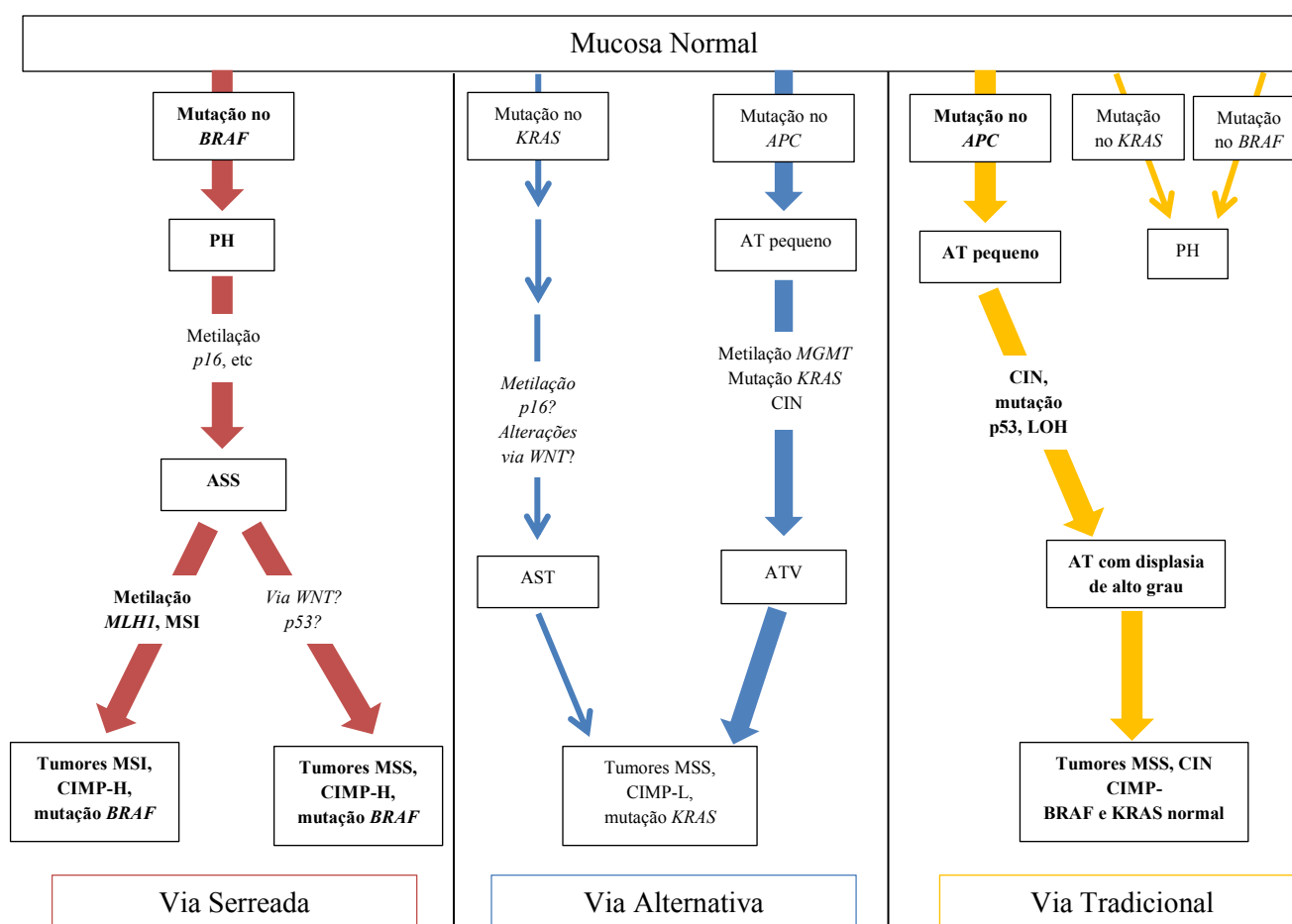


Figura 6 – Modelo de tumorigênese colorectal (Adaptado de: Leggett e Whitehall, *Gastroenterol.*, 2010). Via Serreada – predisposição para níveis elevados de metilação, que aumentam à medida que a lesão progride; Via Alternativa – predisposição para níveis baixos de metilação. Este esquema representa as vias predominantes, no entanto, deverá haver sobreposição entre elas. Ainda não são bem conhecidas todas as alterações genéticas. As vias representadas a negrito são as que estão melhor caracterizadas, ao passo que as vias a *itálico* representam suposições. CIMP-H (CIMP-*High*, elevados níveis de metilação); CIMP-L (CIMP-*Low*, baixos níveis de metilação).

1.2.3.1. Via serreada

Na via serreada, os pólipos serreados são considerados as lesões precursoras de CCR (Young e Jass, 2006). Esta via compreende alterações moleculares muito específicas, como é o caso da metilação das ilhas CpG na região promotora de vários genes (CIMP), conduzindo à inativação de genes supressores de tumor. A presença de mutações no oncogene *BRAF* também parece estar associada ao desenvolvimento de CCR nesta via.

De facto, a ocorrência de mutações no oncogene *BRAF* é uma alteração característica da via serreada, e parece ser um dos eventos genéticos mais precoces

na iniciação de tumorigénese associada à polipose serreada (Leggett e Whitehall, 2010; Ahn et al., 2012). O gene *BRAF* codifica para uma proteína denominada BRAF que faz parte da família das proteínas RAF, sendo uma serina-treonina-quinase que medeia respostas celulares a sinais de crescimento, (tais como: TGFβ (*Transforming growth factor beta*) e EGF (*Epidermal growth factor*)) através da via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK (*mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-extracellular signal-regulated kinase*), também designada por MAPK (*mitogen activated protein kinase*), da qual o gene *KRAS* também faz parte (Figura 7) (Kambara et al., 2004; Noffsinger, 2009; Ahn et al., 2012).

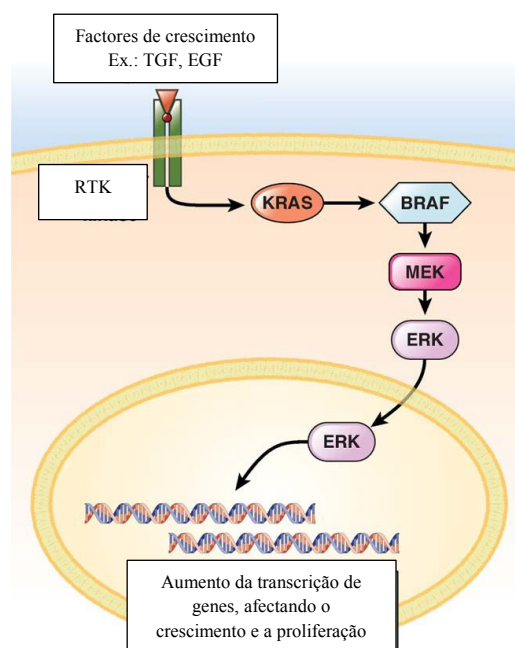


Figura 7 - Via RAS-RAF-MEK-ERK; Adaptado de Leggett e Whitehall, *Gastroenterol.*, 2010; As proteínas KRAS e BRAF intervêm na transdução de sinal da via de sinalização MAPK, a partir de estímulos extracelulares. Quando a ERK se encontra activa, é translocada para o núcleo da célula, onde vai activar factores de transcrição, alterando a expressão de genes que regulam o crescimento e a proliferação celular. RTK – *Receptor of tyrosine kinase*.

Esta via regula a expressão génica e a apoptose celular. Quando ocorrem mutações nos oncogenes *BRAF* e *KRAS*, há uma activação constitutiva da via, resultando numa proliferação celular descontrolada. No caso do *BRAF*, existe um “hotspot” para a ocorrência de mutações – uma transversão de T>A na posição 1796, que provoca a alteração de um aminoácido, de valina para glutamato, no resíduo 600

(V600E) promovendo uma alteração do domínio quinase desta proteína (Vandrovcova et al., 2006; Leggett e Whitehall, 2010).

As mutações no *BRAF* são encontradas em cerca de 30-75% dos tumores com MSI, ao contrário das mutações no *KRAS* que parecem ser mais frequentes em tumores MSS. Verificou-se que o gene *BRAF* não se encontra mutado em casos de HNPCC, o que parece realçar a sua associação com a via serrada. Para além disso, parece haver uma correlação entre as mutações no *BRAF* e o fenótipo CIMP, uma vez que ambas as alterações são encontradas conjuntamente em tumores colorectais (Vandrovcova et al., 2006; Leggett e Whitehall, 2010). Verificou-se que a maioria dos ASS (75-83%) possui mutações no *BRAF* e exibe um nível elevado de CIMP (CIMP-H), associando, deste modo, estas alterações à via serrada (Leggett e Whitehall, 2010).

Em condições normais, a proteína BRAF, induz o início da proliferação seguida de senescência celular. Quando ocorrem mutações no *BRAF*, surge um foco proliferativo inicial, que é seguido de um aumento de expressão do gene *p16INK4a* e um aumento de secreção de IGFBP7 (*Insulin-like growth factor binding protein 7*), resultando em senescência celular, se não ocorrerem mais alterações. É este evento que permite a transformação do epitélio cólico normal em PH. No entanto, quando ocorre o silenciamento de genes que regulam o ciclo celular, devido à metilação de DNA, como é o caso do gene *p16INK4a*, *IGFBP7* e *p53*, a célula escapa à apoptose, progredindo deste modo, para ASS (Figura 8) (Leggett e Whitehall, 2010; Guarinos et al., 2012).

A metilação do DNA, é considerada como um evento epigenético e não um evento genético, uma vez que é a expressão génica que é alterada e não o código genético (Leggett e Whitehall, 2010; Venkatachalam et al., 2010).

Cerca de metade de todos os genes possui, nas suas regiões promotoras, ilhas CpG, em que mais de 50% dos nucleótidos dessas regiões geralmente são em conteúdo GC (Bock et al., 2006; Leggett e Whitehall, 2010; Venkatachalam et al., 2010). Estas ilhas CpG podem ser metiladas, através da adição de um grupo metil a uma citosina, pelos enzimas DNA metiltransferases (DNMT), e ocorrem em 20-30% de todos os CCR, (Leggett e Whitehall, 2010; Venkatachalam et al., 2010; Boland e Goel, 2010).

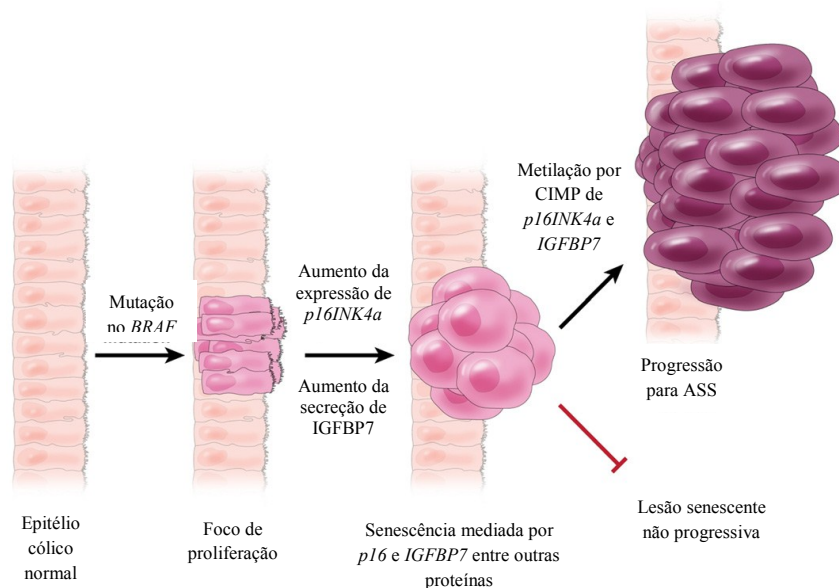


Figura 8 – Iniciação tumoral – via serreada; Adaptado de: Leggett e Whitehall, *Gastroenterol.*, 2010; A activação da via MAPK resultante de mutações no *BRAF* é acompanhada por um foco proliferativo inicial, seguido de um aumento de expressão de *p16INK4a* e num aumento de secreção de IGFBP7, que resulta em senescência celular. O silenciamento de qualquer um dos dois genes em questão, por metilação através de CIMP, facilita o escape à apoptose e a progressão para ASS.

A hipermetilação das ilhas CpG está relacionada com o silenciamento de genes supressores tumorais ou genes de reparação de erros do DNA (como é exemplo: o gene *MLH1* e o gene *MGMT* (*O*-6-methylguanine-DNA-methyltransferase) que, quando silenciados, contribuem para o desenvolvimento tumoral (Venkatachalam et al., 2010; Boland e Goel, 2010). Um subgrupo de tumores colorectais com MSI apresenta também CIMP. No entanto, entre os tumores CIMP, cerca de metade não apresenta metilação do promotor do gene *MLH1* nem MSI (Leggett e Whitehall, 2010; Boland e Goel, 2010).

Os ASS que adquirem metilação no gene *MLH1*, e consequentemente MSI, poderão evoluir para tumores que apresentam mutações no *BRAF*, fenótipo CIMP-H e MSI. No entanto, se não adquirirem metilação no gene *MLH1*, os ASS podem também evoluir para tumores semelhantes aos anteriores, mas sem MSI. Esta progressão parece estar associada à activação da via WNT- β -catenina, por mutações no gene *APC*, por exemplo (Figura 6) (Leggett e Whitehall, 2010).

1.2.3.2. Via alternativa

Nem todos os tumores no contexto de polipose serreada apresentam as características moleculares da via serreada. Existem tumores que não apresentam mutações no gene *BRAF* e que não têm MSI nem CIMP-H, pelo que, a via serreada não explica o seu desenvolvimento tumoral. Assim, foi recentemente proposta uma via alternativa de tumorigénese (Leggett e Whitehall, 2010)

Os tumores que não apresentam mutações no *BRAF* têm geralmente mutações no *KRAS* (Leggett e Whitehall, 2010). Estes tumores apresentam também baixos níveis de metilação (CIMP-L), e são geralmente tumores com microssatélites com instabilidade de baixo grau (MSI-L) ou MSS. Na maior parte das vezes, estes tumores estão também associados ao silenciamento do gene *MGMT*, por hipermetilação do seu promotor (Leggett e Whitehall, 2010; Guarinos et al., 2012). Assim, nesta via, a mutação no *KRAS* será um evento precursor, que associado à metilação ou até a alterações na via WNT dará origem a um AST que depois evoluirá para carcinoma, por mecanismos ainda não conhecidos e com as características descritas anteriormente. Por outro lado, e uma vez que os ATV têm características comuns com pólipos serreados (a arquitectura vilosa, semelhante às características viliformes dos AST; a activação da via MAPK; a elevada frequência de eventos de metilação e a elevada produção de muco) pensa-se que também possam fazer parte desta via. Neste caso, o evento tumoral seria a mutação no gene *APC*, dando origem a um AT pequeno, que por metilação do *MGMT* e mutação no *KRAS* evoluíram para ATV que depois progride para carcinoma (Figura 6) (Leggett e Whitehall, 2010).

Assim, no modelo da via alternativa (Figura 6), o *KRAS* pode adquirir mutações após o sinal de activação da via WNT, facilitando a progressão de AT pequeno para ATV. Daí que, apesar do *KRAS* estar envolvido na mesma via de sinalização que o *BRAF*, mutações nestes dois genes não são equivalentes, nem apresentam consequências funcionais semelhantes (Leggett e Whitehall, 2010).

1.2.4. Polipose serreada com história familiar de pólipos e/ou CCR

Nos últimos anos têm surgido evidências de que a PS pode ocorrer em vários membros da mesma família, com consequente aumento do risco de desenvolvimento de CCR e de possíveis tumores extracólicos (como tumores pancreáticos) em familiares de doentes com PS (Young e Jass, 2006; Rosty et al., 2011; Win et al., 2012).

Num estudo desenvolvido por Rashid et al., em que se estudaram 13 indivíduos com PS, verificou-se que a probabilidade de desenvolvimento de CCR em familiares desses doentes era cerca de 27%, e que a PS pode desenvolver-se em vários indivíduos da mesma família (Rashid et al., 2000; Young e Jass, 2006). Num estudo realizado no IPOLFG, E.P.E. em 14 indivíduos com PS, verificou-se que 57% tinham um parente em primeiro grau com pólipos, e que 33% apresentavam história familiar de CCR (Lage et al., 2004; Young e Jass, 2006). Também Boparai et al. e Win et al. verificaram que familiares de indivíduos com PS têm um risco de desenvolver CCR, cerca de 5 vezes superior ao da população em geral e um risco de desenvolverem PS, cerca de 39 vezes superior (Boparai et al., 2010; Win et al., 2012).

No entanto, a base genética que leva à susceptibilidade para o desenvolvimento de PS e, consequentemente, que se associa ao risco familiar de PS, ainda não é conhecida (Leggett e Whitehall, 2010; Rosty et al., 2011).

1.3. Genes candidatos para susceptibilidade para a polipose serrada

A partir de estudos realizados pelo grupo de gastroenterologia do IPOLFG, E.P.E., e a partir de estudos documentados na literatura, foram encontradas determinadas alterações associadas a genes (germinais ou somáticas, dependendo dos genes), nomeadamente: *AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*, que tornam estes genes, genes candidatos para a susceptibilidade de desenvolvimento de PS.

1.3.1. *AXIN2*

O gene *AXIN2* (*Axis inhibition protein 2*) localiza-se no cromossoma 17q23.2 (Figura 9), numa região que apresenta elevada frequência de perda de heterozigotia (LOH) em casos de tumores da mama, neuroblastomas e outros tumores (NCBI), sendo constituído por dez exões e nove intrões, com um tamanho aproximado de 2.5kb de DNA genómico.

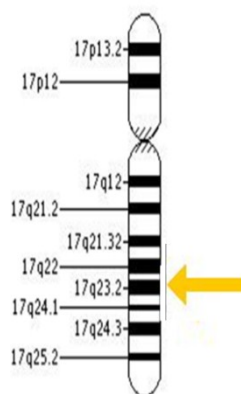


Figura 9 – Localização do gene *AXIN2* no cromossoma 17 humano;

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/AXIN2>

Este gene codifica para uma proteína com o mesmo nome (também designada por conductina), que intervém na via de sinalização WNT e que faz parte do complexo de degradação da β -catenina, sendo por isso um regulador negativo da β -catenina (Jho et al., 2002; Kim et al, 2009). A *AXIN2* é uma proteína constituída por 843 aminoácidos, e contém um domínio RGS (regulador da sinalização a proteínas G), um domínio de ligação à GSK-3 β , um domínio de ligação à β -catenina, um domínio de ligação à proteína PP2Ac (*protein phosphatase 2A, subunit C*) e um domínio DIX (domínio de ligação às proteínas Dsh e AXIN) (Figura 10).

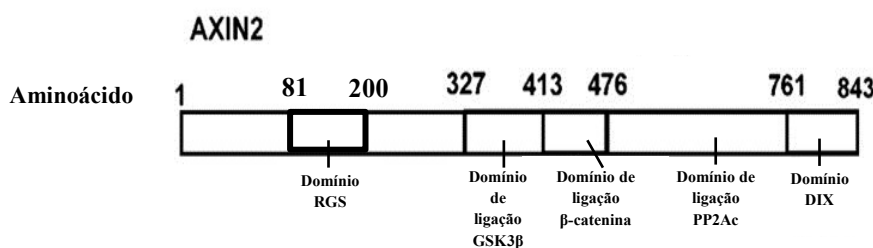


Figura 10 – Representação esquemática da proteína *AXIN2*; Adaptado de: Kim et al., *Hum. Pathol.*, 2009

Num estudo prévio realizado pelo grupo de gastroenterologia da UIPM, (Silva et al., submetido para publicação), em doentes com PS, foi encontrada uma mutação germinal homozigótica *in frame*, que leva à deleção de 12 pb, no exão 7 do gene *AXIN2*, num indivíduo de uma das famílias estudadas. Foram também analisadas duas das filhas deste indivíduo, que se revelaram ambas heterozigóticas para a

referida mutação, sendo que uma delas apresentava 11 PH aos 42 anos. Para além disso, foi observado que os PH deste indivíduo (indivíduo índice), apresentavam uma menor expressão do gene *AXIN2*, em comparação com mucosas cólicas normais.

Num estudo realizado por Lammi et al., foi reportada uma família finlandesa da qual oito membros apresentavam oligodontia (doença autossómica dominante, rara, definida pela falta de seis ou mais dentes definitivos, excluindo os terceiros molares). Para além da oligodontia, os doentes afectados, apresentavam igualmente CCR e/ou pólipos (1-68), nomeadamente PH, AT e ATV. Foram pesquisadas mutações germinais no gene *AXIN2* desses doentes e foi encontrada uma mutação *nonsense* no exão 7 (c.1966 C>T) em todos os membros da família que possuíam oligodontia, constatando que essa mutação não aparecia em nenhum dos elementos saudáveis da família. Uma vez que os doentes que apresentavam oligodontia, também apresentavam CCR, concluíram que a mutação segregava com a oligodontia e com CCR (Lammi et al., 2004).

Estes resultados sugerem, que um subgrupo de CCR hereditário (que pode incluir alguns casos de PS) pode ser causado por mutações no gene *AXIN2* (Lammi et al., 2004).

1.3.2. *BMPR1A*

O gene *BMPR1A* (*bone morphogenic protein receptor 1A*) localiza-se no cromossoma 10q22.3 (Figura 11) sendo constituído por onze exões e dez intrões, compreendendo aproximadamente 168.5kb de DNA genómico. Este gene codifica para um receptor com o mesmo nome, que está envolvido na via TGF- β /BMP (*transforming growth factor β / bone morphogenic protein*), pertencente à família das serinas/treoninas quinases transmembranares. A proteína BMPR1A tem 532 aminoácidos e possui dois domínios funcionais: o domínio GS (assim denominado por conter nessa região uma sequência de aminoácidos SGSGSG; região da proteína que é fosforilada) e o domínio proteína quinase (Figura 12). Os ligandos deste receptor pertencem à superfamília TGF- β .

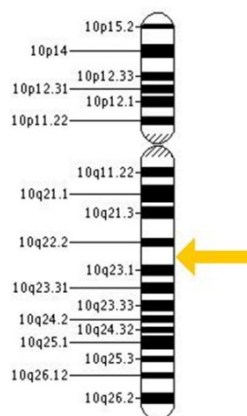


Figura 11 – Localização do gene *BMPR1A* no cromossoma 10 humano;

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BMPR1A>

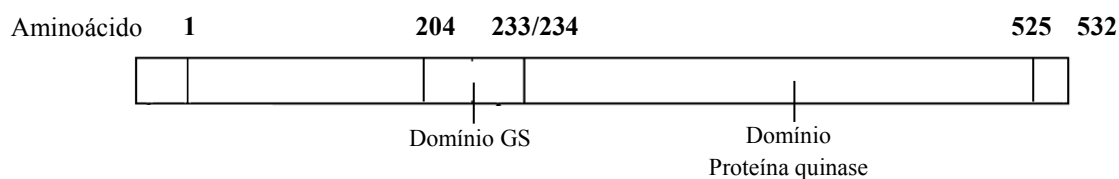


Figura 12 - Representação esquemática da proteína BMPR1A;

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P36894>

A família do TGF- β desempenha um papel importante durante a embriogénese, regulando diversos processos, como é o caso da proliferação e diferenciação celular, e mesmo a apoptose. Esta família é constituída por várias subfamílias, como é o caso a subfamília BMP (Kodach et al., 2008).

Na via de sinalização BMP, as moléculas BMP ligam-se aos receptores transmembranares (BMPR1-A e -B; BMPR2), promovendo a sua heterodimerização e a fosforilação do BMPR1 pelos domínios quinase do BMPR2. O BMPR1 fosforilado induz a fosforilação de proteínas SMAD específicas, como as SMAD 1, 5 e 8. Estas proteínas fosforiladas formam então um complexo, com a proteína SMAD4, sendo depois translocados para o núcleo, onde vão activar a transcrição de genes alvos da via BMP (Figura 13) (Lorente-Trigos et al., 2010; Perotti et al., 2012).

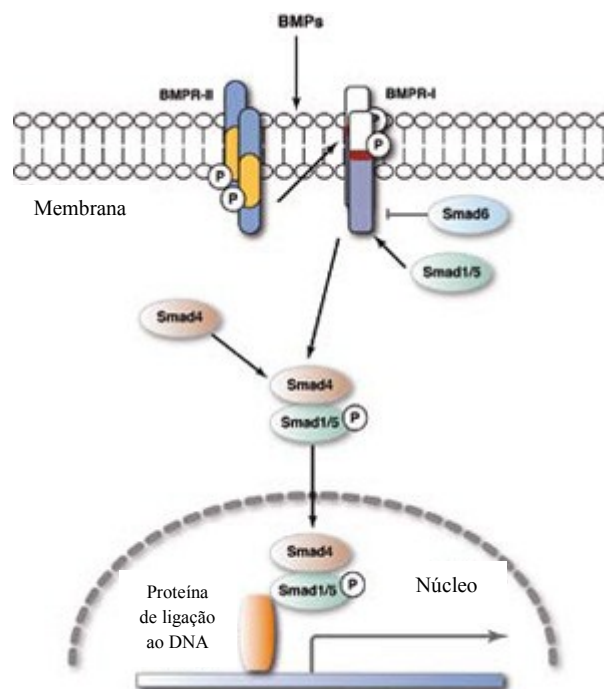


Figura 13 – Via de sinalização BMP; Adaptado de: Yavropoulou e Yovos, *Hormones*, 2007

Brosens et al. descreveram a existência de mutações germinais neste gene, ocorrendo em cerca de 50-60% dos doentes diagnosticados com síndrome de polipose juvenil (Brosens et al., 2011). Foram também descritas mutações germinais no *BMPRIA*, em 4/8 (50%) famílias estudadas com síndrome de polipose mista hereditária (Cheah et al., 2009) (caracterizada pela presença de vários tipos de pólipos no tracto gastrointestinal, nomeadamente pólipos hiperplásicos e adenomatosos no cólon, pólipos mistos assim como pólipos juvenis, e com risco elevado de desenvolvimento de CCR) (Kamocki et al., 2012). Mais recentemente, Nieminen et al., descreveram que a presença de mutações neste gene também é encontrada em cerca de 11% das famílias FCCTX estudadas (Nieminen et al., 2011).

1.3.3. *MGMT*

O gene *MGMT* (*O*-6-methylguanine-DNA-methyltransferase) é um gene de reparação de erros do DNA, que repara resíduos de guanina inapropriadamente metilados, sendo constituído por cinco exões, com um total de aproximadamente 300kb de DNA genómico. Este gene localiza-se no cromossoma 10q26 (Figura 14), e codifica para uma proteína com o mesmo nome composta por dois domínios: o domínio metiltransferase e o domínio de ligação ao DNA (Figura 15).

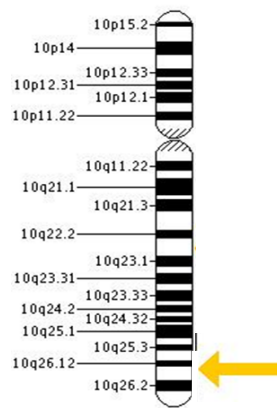


Figura 14 – Localização do gene *MGMT* no cromossoma 10 humano;

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BMPR1A>

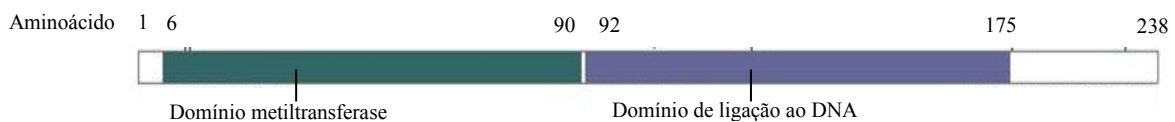


Figura 15 – Representação esquemática da proteína MGMT; Adaptado de:

<http://www.phosphosite.org>

Na ausência de actividade da proteína MGMT, a O⁶-metilguanina (MeG) emparelha erradamente com a timina, durante a replicação do DNA, resultando em transições G:C>A:T. A proteína MGMT catalisa a transferência do grupo metil (CH₃) no DNA para o resíduo de cisteína existente no seu centro activo, sendo deste modo restaurada a estrutura do DNA (Figura 16). A metilcisteína formada no centro activo do MGMT não é convertida novamente em cisteína, daí que a proteína só pode actuar uma única vez. A forma metilada da proteína MGMT sofre então uma alteração conformacional que conduz à sua rápida degradação (Halford et al., 2005).

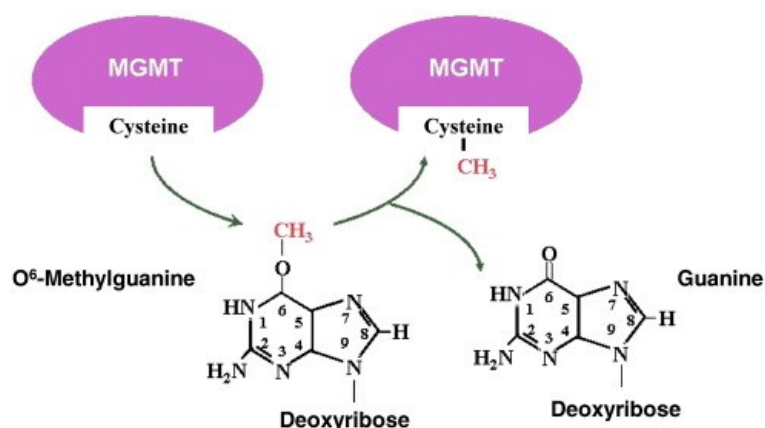


Figura 16 – Reparação dos aductos O⁶-Metilguanina pela MGMT; Adaptado de: Silber et al., *BBA*, 2012; A MGMT cataliza a transferência do grupo metil (CH₃) que se encontra ligado ao O⁶ da guanina no DNA, para o resíduo de cisteína existente no seu centro activo.

A hipermetilação do promotor do gene *MGMT* conduz à sua inactivação, resultando numa diminuição da expressão nuclear desta proteína em vários tecidos, nomeadamente no tecido cólico, pelo que tem sido associado à tumorigénese colorectal (Halford et al., 2005).

Geralmente, a metilação do *MGMT* está associada a mutações no *KRAS* e a CIMP-L, como referido anteriormente (Leggett e Whitehall, 2010).

Num estudo realizado pelo grupo de gastroenterologia da UIPM do IPOLFG, E.P.E., em doentes com PS, verificou-se que 57% das lesões desses indivíduos apresentavam metilação do *MGMT* (Silva et al., submetido para publicação).

Tendo em conta que, a metilação pode constituir um de dois eventos genéticos, responsáveis pela susceptibilidade para PS, permanece por identificar o outro evento e a sua contribuição para a tumorigénese. Esse outro evento pode ser um evento somático – por exemplo perda de heterozigotia, ou então um evento germinal – uma mutação germinal no gene *MGMT*.

2. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo de genes candidatos de modo a identificar genes e/ou variantes de susceptibilidade para o desenvolvimento de polipose serreada. Adicionalmente, com o estudo destes genes (*AXIN2*, *BMPRI4* e *MGMT*) pretendeu-se também contribuir para a caracterização molecular deste síndrome e das vias de tumorigénese envolvidas no mesmo.

3. Procedimento experimental

3.1. Material biológico

Para o estudo dos genes *AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT* foram seleccionados 12 indivíduos que preenchem pelo menos um dos critérios de PS, seguidos na Clínica de Risco Familiar do IPOLFG, E.P.E., na Consulta de Risco Familiar de Cancro do Cólon e Recto; 10 dos indivíduos estudados apresentavam história de PS, CCR e/ou pólipos em familiares de 1º grau, e 2 dos indivíduos eram casos esporádicos de PS (assim classificados porque os familiares em 1º grau eram assintomáticos, ou porque as colonoscopias realizadas nestes familiares não apresentavam lesões). Foram também incluídos, um total de 9 familiares de alguns dos indivíduos *proband* destas famílias, de modo a efectuar estudos de segregação de algumas variantes genéticas com a doença. Na análise do *BMPRIA* foram ainda estudados 3 indivíduos adicionais (2 com polipose juvenil e 1 com polipose mista). A análise mutacional foi realizada a partir de DNA genómico extraído de sangue periférico de cada indivíduo. Para o gene *BMPRIA*, foi ainda analisado o RNA de uma das amostras incluídas no estudo, de modo a complementar a análise mutacional para a referida amostra. No caso do gene *MGMT* foi ainda realizada a análise da perda de heterozigotia (LOH) do *locus* deste gene em 47 amostras de DNA genómico extraído a partir de tecido incluído em parafina, obtido de várias lesões de polipose serrada (PH, ASS, AST, AT, ATV e carcinomas), e respectiva mucosa normal ou sangue periférico. Estas amostras, provenientes do serviço de Anatomia Patológica do IPOLFG, E.P.E., foram obtidas dos mesmos indivíduos seleccionados para a análise de mutações germinais. A tabela com as características clínicas dos doentes com PS, que foram estudados neste trabalho, encontra-se no Anexo 1.

3.2. Métodos

3.2.1. Extracção de DNA genómico a partir de sangue periférico

O DNA genómico correspondente a cada amostra utilizada neste estudo, já tinha sido extraído previamente.

A extracção do DNA genómico a partir de sangue periférico foi realizada utilizando o kit comercial *CITOGENE – Genomic DNA Purification Kit* (Citomed), de acordo com o descrito pelo fabricante. Posteriormente, o DNA foi quantificado no

espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), e uma alíquota foi depois diluída em água destilada (80ng/μl), e armazenado a -20°C.

3.2.2. Extracção de DNA genómico a partir de tecido incluído em parafina

O DNA genómico correspondente a cada amostra utilizada neste estudo, já tinha sido previamente extraído, através de uma extracção fenol-clorofórmio. Uma vez que o DNA resultante desta extracção, se pode encontrar muito fragmentado e também pelo facto de alguns dos componentes utilizados nesta extracção absorverem ao mesmo comprimento de onda que o DNA (260nm), este não deve ser quantificado espectrofotometricamente, pelo que foi quantificado por electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) por comparação com padrões de DNA com concentração conhecida.

3.2.3. Extracção de RNA a partir de sangue periférico

A extracção de RNA a partir de sangue periférico foi realizada através do método descrito para o reagente *Trizol* da *Invitrogen* (Anexo 2). As amostras de RNA foram posteriormente armazenadas a -80°C.

3.2.4. Análise de mutações germinais nos genes *AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*

3.2.4.1. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR (Reacção em cadeia da polimerase) baseia-se na amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA de interesse por replicação, onde se obtêm milhares de cópias da cadeia original. Esta amplificação é efectuada partindo de quantidades mínimas de material genético, recorrendo a dois *primers* (oligonucleótidos iniciadores de cadeia) de sequência conhecida e específica para o fragmento a amplificar, que vão hibridar com as extremidades 3'-OH da cadeia dupla de DNA. Para além dos *primers*, esta reacção necessita ainda de outros componentes: DNA genómico; enzima DNA *Taq* polimerase (extraída de uma bactéria termofílica – *Thermus aquaticus*, sendo termoestável e termorresistente mantendo a sua actividade a temperaturas elevadas); uma solução tampão (que permite a manutenção do pH óptimo para a actividade enzimática); dNTP's; e ainda iões magnésio – Mg²⁺ (co-factor enzimático).

Este processo envolve três fases que se repetem durante vários ciclos, (geralmente 30 a 40). As fases do PCR, realizadas no termociclador são: desnaturação (separação da cadeia dupla de DNA molde através da quebra das pontes de hidrogénio, estabelecidas entre bases complementares, realizada a cerca de 95°C); annealing ou hibridação dos *primers* (ligação dos *primers* às cadeias simples de DNA, a uma temperatura variável – entre 50-70°C) e elongação (a DNA *Taq* polimerase adiciona nucleótidos à cadeia molde no sentido 5'-3', sintetizando uma nova cadeia de DNA complementar à cadeia molde, a 72°C).

3.2.4.2. Optimização das reacções de PCR

As condições óptimas para as reacções de PCR foram optimizadas para cada fragmento a amplificar, de modo a que apenas a banda de DNA de interesse fosse amplificada (com a excepção de alguns fragmentos, para os quais já tinham sido optimizadas as referidas condições). Essa optimização baseou-se no ajuste de diversos parâmetros, tais como: o número de ciclos da reacção, a concentração de Mg^{2+} , a temperatura a que ocorre a hibridação e a concentração dos *primers*.

Para a optimização de uma reacção de PCR na qual não se observou qualquer amplificação do fragmento a estudar, de um modo geral, foi necessário diminuir a temperatura de hibridação dos *primers*. Por outro lado, nos casos em que se observou a existência de fragmentos inespecíficos, optou-se pelo aumento da temperatura e/ou da concentração de Mg^{2+} e/ou diminuição do número de ciclos da reacção. Nos casos em que se realizaram estas alterações e ainda se verificou inespecificidade, utilizou-se um estabilizador de DNA, como é o caso do dimetilsulfóxido (DMSO), que melhora a desnaturação, sendo também bastante útil para sequenciação de fragmentos que na sua sequência possuem um elevado conteúdo em GC.

3.2.4.3. Amplificação por PCR dos vários exões dos genes *AXIN2*, *BMPRI1A* e *MGMT*

Todos os *primers* utilizados para a amplificação de cada fragmento dos genes *AXIN2*, *BMPRI1A* e *MGMT* já tinham sido desenhados previamente.

O gene *AXIN2* foi analisado em treze fragmentos, o gene *BMPRI1A* em dez fragmentos, enquanto que o gene *MGMT* foi analisado em seis fragmentos, tendo sido analisadas todas as sequências codificantes e regiões flanqueadoras dos exões (as sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas no Anexo 3).

Para cada amostra, foi preparada uma mistura prévia, para um volume de 11,5µl, contendo todos os reagentes necessários para a reacção de PCR, e foi adicionado 1µl do DNA genómico respectivo. Todas as condições utilizadas na amplificação por PCR dos fragmentos dos genes em estudo, encontram-se descritas no Anexo 4. Em seguida, as reacções de PCR foram executadas num termociclador *Veriti (Applied Biosystems)*, no qual se utilizou o programa descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Programa (SEQ) utilizado na amplificação por PCR dos fragmentos de cada gene estudado

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5min	1
Desnaturação	94°C	50seg	30 a 40
Hibridação	Variável	30seg	
Extensão	72°C	50seg	
Extensão final	72°C	7min	1
	15°C	-	-

3.2.4.4. Controlo da eficiência dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose

Após a reacção de PCR, foi realizado o controlo da eficiência da reacção através da realização de uma electroforese em gel de agarose 2% (p/v) ou 1% (p/v) (consoante o peso molecular do fragmento a amplificar), de modo a permitir a separação de fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular, através da aplicação de um campo eléctrico.

Na preparação do gel de agarose foi adicionado brometo de etídio (10 mg/mL, *Biotechnology*), que permitiu a visualização dos produtos amplificados quando sujeitos a radiação ultravioleta, num transiluminador (*BioDocAnalyze, Biometra*).

Para o controlo da eficiência das optimizações, foi utilizado o volume total da amostra após o PCR, para a realização da electroforese. Para tal utilizaram-se os 12,5µl do produto de PCR, ao qual foram adicionados 3µl de *Orange G 5x*, sendo que este reagente é um tampão de amostra, que tem a finalidade de lhe conferir densidade, facilitando a deposição do produto amplificado no poço do gel e permitindo também a visualização da migração das amostras no decurso da electroforese. Para o controlo da eficiência das reacções de PCR correspondentes à amplificação dos vários exões, para cada amostra de DNA, utilizaram-se 3µl do produto amplificado juntamente com 7µl de *Orange G 1x* (Nota: este procedimento foi o mesmo para o controlo da eficiência da amplificação na análise de LOH – ponto 3.2.5.1. e para o controlo do resultado da purificação do DNA a partir de gel de

agarose *QIAquick Gel Extraction (Qiagen)* – ponto 3.2.4.6.). Também se aplicou no gel, um marcador de peso molecular – *pUC Mix* marcador 8 (*Fermentas*), que apresenta um padrão de bandas referência de 67-1118pb, permitindo determinar o tamanho em pares de base do fragmento amplificado. A electroforese realizou-se a uma voltagem de 140V durante, aproximadamente, 30 minutos.

A partir das bandas obtidas, foi possível calcular-se a quantidade de produto a usar para a reacção de sequenciação (o mesmo se aplica para a análise dos marcadores de microssatélites – ponto 3.2.5.2.). A preparação de todas as soluções utilizadas nesta técnica encontra-se descrita no Anexo 5.

3.2.4.5. Reacção de transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR)

O cDNA (DNA complementar) é obtido a partir de uma cadeia molde de mRNA, através da técnica RT-PCR. Esta técnica baseia-se numa reacção de transcrição reversa, que utiliza um enzima, a transcriptase reversa, para converter o RNA em cDNA de cadeia simples, e posteriormente converte o híbrido RNA-cDNA, em moléculas de cDNA de cadeia dupla, que serão depois amplificadas numa reacção de PCR.

Para a síntese de cDNA, foi necessário juntar um volume variável de RNA de cada amostra (correspondente a uma concentração final de 1µg de RNA), 0,5µl de hexâmeros de *primers* (3µg/µl, *Roche*) – mistura de hexanucleótidos com terminações aleatórias 5' e 3' com grupo hidroxilo, e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, *Merck*) – que tem como função inactivar os enzimas RNase; até perfazer um volume final de 7,75µl. A mistura foi posteriormente desnaturada num termociclador a 70°C, durante 10 minutos, e depois colocada em gelo. De seguida, foi adicionada uma mistura reaccional, composta por 4µl de dNTPs (25mM, *GE Healthcare*); 4µl de tampão 5x (*Invitrogen*), 2µl de ditioneitol (DTT) (0,1M, *Invitrogen*) – que é um estabilizador enzimático e proteico; 0,75µl de RNaseOUT™ (40U/µl, *Invitrogen*) – inibidor da acção das ribonucleases; 1µl de enzima transcriptase reversa *Superscript* (200U/µl, *Invitrogen*) e 0,5µl de enzima *single strand binding protein (SSB)* (4,47µg/ml, *Promega*), que se liga às cadeias simples de RNA, evitando desta maneira a sua hibridação prematura. Em seguida, foi

realizada a reacção de transcrição reversa num termociclador *Veriti (Applied Biosystems)*.

O programa utilizado para a síntese de cDNA encontra-se esquematizado na Tabela 4.

Tabela 4 – Programa de RT-PCR utilizado na síntese de cDNA num termociclador *Veriti (Applied Biosystems)*

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	70°C	10min
	15°C	-
Reacção de RT-PCR	42°C	60min
	70°C	15min
	15°C	-

De maneira a confirmar a síntese de cDNA efectuada, realizou-se a amplificação por PCR do gene *G6PD – glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*, que se encontra localizado em Xq28, sendo expresso de forma ubíqua em todas as células humanas. O controlo de eficiência do produto amplificado foi realizado em gel de agarose 2% (p/v), tal como descrito em 3.2.5.. Após a confirmação da síntese de cDNA, o gene *BMPRIA* foi amplificado por PCR, consoante as condições descritas no Anexo 6, tendo sido depois, controlado o produto total de PCR, em gel de agarose a 1% (Anexo 5), uma vez que a banda de cDNA esperada possuía mais de 2000pb. Devido ao tamanho deste fragmento, foi utilizado um marcador que possui um padrão de bandas de referência entre 125-23120pb – marcador Lambda/HindIII (*Fermentas*) (Anexo 5).

3.2.4.6. Purificação dos produtos amplificados por PCR

Após amplificação por PCR, dos fragmentos em estudo, estes foram submetidos a uma purificação. A purificação permite eliminar *primers* que não hibridaram, pequenos fragmentos de ácidos nucleicos que hibridaram com os *primers* de forma inespecífica, e mesmo sais que possam existir.

Para a purificação foram adicionados 2µl da enzima ExoSAP-IT® a 9,5µl do produto amplificado, perfazendo um volume final de 11,5µl. Em seguida, as amostras foram colocadas num termociclador *Biometra (Alfagene)*, cujo programa utilizado se encontra descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Programa utilizado na purificação do produto amplificado por PCR no termociclador *Biometra (Alfagene)*

Temperatura	Tempo
37°C	15 min
80°C	15 min
4°C	-

Para alguns fragmentos não foi possível eliminar completamente todas as bandas inespecíficas no PCR, pelo que foi necessário recorrer à extracção e purificação do produto amplificado a partir da banda observada no gel de agarose 2% (p/v), utilizando-se o *kit* de purificação de DNA a partir de gel de agarose *QIAquick Gel Extraction (Qiagen)*, cujo protocolo se apresenta no Anexo 7.

Terminada a purificação através deste *kit*, foi avaliado o resultado da purificação através de electroforese em gel de agarose 2% (p/v), como descrito no ponto 3.2.4.4..

3.2.4.7. Sequenciação automática

A sequenciação de DNA permite a caracterização completa de um fragmento de DNA. Nesta técnica, são usados ddNTP's (didesoxirribonucleótidos) que se encontram marcados com fluorocromos de cor diferente, permitindo a marcação e distinção das bases A, C, T e G. Os ddNTP's encontram-se truncados no grupo 3'OH impedindo assim a formação de novas ligações fosfodiéster. Desta maneira, a sua incorporação aleatória na cadeia sintetizada irá resultar numa cadeia truncada. Após a reacção, efectua-se uma electroforese capilar, de maneira a que ocorra a separação das cadeias truncadas, por peso molecular, obtendo-se no final a sequência de nucleótidos do DNA em estudo.

3.2.4.7.1. Reacção de sequenciação

Foram preparadas duas reacções para cada fragmento a sequenciar, uma para o *primer forward* (5') e a outra para o *primer reverse* (3'). Cada reacção foi preparada num tubo tipo *eppendorf* de 0,2ml com um volume final de 20µl. A cada um dos tubos foi adicionada uma quantidade variável de DNA genómico purificado; 2µl de tampão de sequenciação *Buffer Sequencing 5x, BigDye™ Terminator v1.1 (Applied Biosystems)*; 2µl do respectivo *primer* (5' ou 3') (1,6pmol/µl) do fragmento a analisar; quantidade variável (dependente do tamanho em pb de cada fragmento e

da intensidade da banda obtida após o controlo da eficiência da reacção de PCR) da mistura reaccional de sequenciação *BigDye™ Terminator v1.1* (*Applied Biosystems*) e água bidestilada, de modo a perfazer os 20µl. A reacção de sequenciação foi efectuada num termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*), utilizando o programa referido na Tabela 6. As sequências dos *primers* utilizadas na sequenciação encontram-se descritas no Anexo 3.

Tabela 6 – Programa (SEQAUTO) utilizado para a reacção de sequenciação num termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*)

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96°C	5min	1
Desnaturação	95°C	10seg	25
Hibridação	Variável	5seg	
Extensão	60°C	4min	
	4°C	-	-

3.2.4.7.2. Precipitação e purificação do produto da reacção de sequenciação

Após a reacção de sequenciação, realizou-se a precipitação e purificação do DNA. Para tal foi efectuada uma mistura reaccional de EDTA (125mM) – que quelata os iões Mg^{2+} que se encontrem na solução; acetato de sódio (3M) – que neutraliza as cargas dos ácidos nucleicos e etanol absoluto – que juntamente com o acetato de sódio, promove a precipitação do DNA. Posteriormente foi adicionado o volume total do produto da reacção de sequenciação, e seguiu-se o protocolo Etanol/EDTA/Acetato de Sódio recomendado pelo *kit* de sequenciação *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*) (Anexo 8).

3.2.4.7.3. Preparação das amostras para sequenciação automática

Após a precipitação e purificação do produto da reacção de sequenciação (3.2.4.7.2.), prepararam-se as amostras para a análise no sequenciador automático. Adicionaram-se 17µl de formamida a cada *pellet*, homogeneizou-se no *vórtex* e depois todo o conteúdo foi transferido para uma placa apropriada para o aparelho de sequenciação. Seguidamente, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante pelo menos 5 minutos, num termociclador *Biometra* (Alfagene), e colocadas em gelo assim que se retiraram do aparelho. A placa contendo as amostras foi então colocada no sequenciador automático *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* (*Applied*

Biosystems) ou então, no sequenciador automático *ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), onde decorreu a electroforese capilar a 50°C, a uma voltagem de 15KV.

3.2.4.7.4. Análise de resultados

Os resultados obtidos, foram analisados pelo *software Sequencing Analysis*, obtendo-se um electroforectograma que foi depois comparado manualmente com as sequências de DNA de referência, correspondentes a cada fragmento (Tabela 7), de modo a se identificarem possíveis alterações.

Tabela 7 - Identificação das sequências nucleotídicas de referência para cada gene analisado

Gene	Número de identificação da sequência	Base de dados	Data de consulta
<i>AXIN2</i>	NG_012142.1	NCBI	19/06/2012
<i>BMPRI4</i>	NG_009362.1	NCBI	19/06/2012
<i>MGMT</i>	NC_000010.10	NCBI	07/11/2012

3.2.4.7.5. Análise *in silico* das mutações germinais identificadas

De maneira a estudar a eventual patogenicidade de algumas das mutações germinais encontradas, realizou-se uma análise *in silico* das mutações germinais que não se encontravam descritas na literatura. Para estudar as consequências a nível da função/estrutura da proteína de uma determinada mutação *missense* (substituição de aminoácido), recorreu-se ao *software Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)*, versão 4.0.3 disponível em: <http://sift.jcvi.org/> (Kumar et al., 2009) e *Polymorphism Phenotyping - v2 (Polyphen2)* disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (Adzhubei et al., 2010). No caso de mutações intrónicas, foi avaliada a possibilidade de poderem provocar a alteração do local de ligação a um factor de *splicing*. Para este efeito, foi utilizado o *software Exonic Splicing Enhancer (ESE) Finder* disponível em: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi> (Smith et al., 2006) e o *software Human Splicing Finder* disponível em: <http://www.umd.be/HSF> (Desmet et al., 2009).

Ainda se avaliaram todas as mutações no *software Variant Effect Predictor (VEP)* do *Ensembl*, disponível em: <http://ensembl.org> (McLaren et al., 2010).

3.2.5. Análise de perda de heterozigotia (LOH) do gene *MGMT*

Os marcadores de microssatélites utilizados foram seleccionados mediante os seguintes critérios: a sua localização na região de interesse, a percentagem de heterozigotia (de preferência superior a 70%) e o tamanho do produto amplificado (de preferência até cerca de 200pb, uma vez que o DNA extraído de tecido incluído em parafina, se encontra geralmente degradado).

Foram utilizados três marcadores de microssatélites neste estudo: D10S1676, D10S1651 e D10S169, que flanqueiam o gene *MGMT*.

No Anexo 9 encontra-se a localização molecular destes marcadores de microssatélites, bem como as características dos mesmos, e as condições utilizadas na amplificação. O *primer forward* de cada marcador de microssatélites foi marcado com um fluorocromo (FAM) para que as amostras, possam ser visualizadas por fluorescência no sequenciador.

O DNA genómico para a realização desta análise foi extraído consoante o método descrito em 3.2.2..

3.2.5.1. Amplificação do DNA para análise de LOH do gene *MGMT*

A amplificação dos marcadores de microssatélites seleccionados, foi realizada pela técnica de PCR para amostras de DNA das várias lesões de polipose serreada e respectiva mucosa cólica normal, de cada indivíduo, de acordo com o descrito no ponto 3.2.4.2.. Os programas de PCR utilizados nesta análise encontram-se descritos nas Tabela 8 e 9. Foram utilizados reagentes de duas marcas distintas (*Bioline* e *Roche*), consoante o marcador de microssatélite a amplificar, pelo que os programas utilizados foram diferentes. O enzima da marca *Roche* – GOLD TAQ DNA, por apresentar “*hotstart*” (apenas inicia a sua actividade a 95°C), ajuda na eliminação de dímeros de *primer*, melhorando a eficiência do PCR.

Tabela 8 – Programa (RER) de PCR usado na amplificação dos marcadores de microssatélites num termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*) com reagentes *Bioline*

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5min	1
Desnaturação	94°C	1min	40
Hibridação	Variável	50seg	
Extensão	72°C	1min30seg	
Extensão final	72°C	10min	1
	15°C	-	-

Tabela 9 – Programa (RER GOLD-PLAT) de PCR usado na amplificação dos marcadores de microssatélites num termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*) com reagentes *Roche*

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	7min	1
Desnaturação	95°C	25seg	40
Hibridação	Variável	25seg	
Extensão	72°C	1min	
Extensão final	72°C	10min	1
	4°C	-	-

O controlo da eficiência dos produtos amplificados foi efectuado por electroforese em gel de agarose 2% (p/v), de acordo com o descrito no ponto 3.2.4.4..

3.2.5.2. Preparação das amostras para análise pelo *software GeneScan*

Para a preparação das amostras, observaram-se as bandas obtidas na electroforese em gel de agarose realizada, correspondentes à intensidade do produto amplificado, de maneira a determinar a quantidade de produto necessário a utilizar para a análise pelo *GeneScan*.

Assim, foi preparada uma mistura que continha 12µl de formamida e 0,5µl de marcador de peso molecular de *GeneScan™ TAMRA 500™* (*Applied Biosystems*), que permite identificar o peso molecular da amostra que vai ser analisada, tendo como base, pesos moleculares conhecidos. Esta mistura foi distribuída por tubos apropriados para o sequenciador automático, e posteriormente foi adicionada uma quantidade variável dos produtos de PCR amplificados. As amostras foram depois desnaturadas num termociclador *Biometra* (Alfagene), durante pelo menos 5 minutos a 95°C, e colocadas em gelo logo de seguida.

Por último, realizou-se a electroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), a uma temperatura de 60°C

e voltagem de 15KV. O tempo de corrida era variável, pois dependia do peso molecular de cada produto amplificado.

3.2.5.3. Análise de resultados

Os resultados foram obtidos, através da análise pelo *software GeneScan*, versão 3.1.2, disponível no *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, em forma de electroforectograma. O *software* fornece os valores da altura, do tamanho (em pb) e das áreas dos picos das amostras, correspondentes aos alelos das amostras de DNA normal e tumoral. Com estes dados foi então efectuada a análise de LOH, com base numa fórmula (apresentada em baixo) que efectua o cálculo da razão entre as áreas dos picos correspondentes aos alelos da amostra de DNA de mucosa cólica normal e tumoral. Todos os valores foram calculados a partir da fórmula apresentada em baixo, e quando eram inferiores a 0,67 (indicativo de perda do alelo de menor peso molecular) ou superiores a 1,5 (indicativo de perda do alelo de maior peso molecular), eram indicativos de LOH.

$$LOH = \frac{AN2 / AN1}{AT2 / AT1}$$

Na fórmula apresentada:

AN1 – área do pico respeitante ao alelo de menor peso molecular da amostra de DNA de mucosa cólica normal;

AN2 – área do pico respeitante ao alelo de maior peso molecular da amostra de DNA de mucosa cólica normal;

AT1 – área do pico respeitante ao alelo de menor peso molecular da amostra de DNA tumoral;

AT2 – área do pico respeitante ao alelo de maior peso molecular da amostra de DNA tumoral.

Nos casos em que o indivíduo era homozigótico para o marcador de microsatélites em questão, ou nos casos em que a lesão apresentava instabilidade de microsatélites, a LOH não pôde ser avaliada.

4. Resultados

4.1. Análise de mutações germinais nos genes *AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*

4.1.1. *AXIN2*

No gene *AXIN2*, foram encontradas treze mutações germinais (Anexo 10 e Tabela 10). Todas as mutações correspondem a substituições de nucleótidos, quatro do tipo *missense*, seis variantes intrónicas, duas variantes na região 3'UTR e uma variante na região 5'UTR, com uma frequência entre 8% e 100% nas amostras analisadas. De mencionar, que a alteração c.2013_2024del12 (delecção *in frame*) no exão 7 do doente A686, já tinha sido identificada num estudo prévio.

Tabela 10 – Identificação das mutações germinais detectadas no gene *AXIN2* e respectiva frequência

Fragmento	Mutação germinal	Homo./Het.	Frequência das mutações nas amostras analisadas
5'UTR	c.1-409 G>C	Homozigotia	42%
		Heterozigotia	42%
Exão 1A	c.148 C>T (P50S)	Homozigotia	33%
		Heterozigotia	42%
Intrão 3	c.1060-77 G>T	Homozigotia	42%
		Heterozigotia	42%
	c.1060-17 C>T	Heterozigotia	17%
	c.1060-287 A>G	Homozigotia	100%
	c.1060-282 A>G	Homozigotia	100%
	c.1060-254 A>G	Homozigotia	100%
Exão 5	c.1365 A>G (P455P)	Homozigotia	83%
		Heterozigotia	17%
	c.1386 C>T (P462P)	Homozigotia	67%
		Heterozigotia	25%
Intrão 5	c.1712+19 G>T	Heterozigotia	17%
Exão 6	c.1889 G>A (S630N)	Heterozigotia	8%
Exão 7	c.2013_2024del12 (671_674 delRTTP)	Homozigotia	8%
Exão 10 (3'UTR)	c.*794 C>A	Homozigotia	8%
		Heterozigotia	17%
	c.*1012 T>A	Homozigotia	58%
		Heterozigotia	25%

A maioria das mutações encontra-se descrita na base de dados NCBI (dbSNP - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> e 1000Genomes - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>) (Tabela 11) como sendo SNV (*single nucleotide variant*), e apresentam uma frequência elevada na população ibérica ou na população em geral, que as enquadra no contexto de variantes polimórficas. Exceptuam-se duas alterações: a c.1889 G>A (p.S630N) no exão 6 (detectada na família PH7), que apenas se encontra descrita a nível somático (COSMIC – <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>), no mesmo tipo de tecido (cólon), não havendo referência a nível germinal; e a c.2013_2024del12 (p.671_674 delRTTP) no exão 7 (detectada na família PH14 num estudo prévio), que se encontra descrita como DIV (*deletion/insertion variation*).

Tabela 11 – Identificação e frequência alélica das variantes detectadas no gene *AXIN2* de acordo com a base de dados NCBI.

Alteração	Identificação base de dados SNP ⁺	Frequência do alelo variante na população [#]
c.1-409 G>C	rs12949046	50% ¹
c.148 C>T	rs2240308	50% ¹
c.1060-77 G>T	rs4541111	32% ¹
c.1060-17 C>T	rs35399989	14% ¹
c.1060-287 A>G	rs4467119	99,86% ²
c.1060-282 A>G	rs4464120	99,86% ²
c.1060-254 A>G	rs6504323	99,91% ²
c.1365 A>G	rs9915936	93% ¹
c.1386 C>T	rs1133683	54% ¹
c.1712+19 G>T	rs7219582	14% ¹
c.*794 C>A	rs10438779	21% ¹
c.*1012 T>A	rs7591	46% ¹

⁺ - Informação retirada da base de dados NCBI - dbSNP; [#] - Informação retirada da base de dados NCBI – 1000 Genomes; ¹ - Frequência do alelo variante na população ibérica; ² - Frequência do alelo variante na população geral

De forma a avaliar a eventual patogenicidade destas duas mutações recorreu-se a uma análise *in silico*. Para além da avaliação da consequência da substituição aminoacídica, utilizando os *softwares* *SIFT* e *Polyphen*, foi também avaliado se as alterações poderiam afectar o *splicing*; por criarem um sítio alternativo que leve à excisão de um exão (*exon skipping*) ou à retenção de parte ou totalidade de um intrão; ou por alterarem a ligação dos factores de *splicing* ao DNA (envolvidos na formação do complexo de *splicing*, ou spliceossoma). Para tal, recorreu-se aos *softwares* *Human Splicing Finder* e *Ese Finder* e ao *software* *Variant Effect Predictor* do *Ensembl* (Tabela 12).

Através da análise *in silico* foi possível verificar, que estas mutações parecem afectar a ligação a factores estimuladores de *splicing* (*splicing enhancers motifs*) e/ou dos factores repressores de *splicing* (*splicing silencer motifs*). A análise da mutação p.S630N, através do *SIFT* e *Polyphen*, classificou-a como benigna/tolerada, o que é concordante com o *Variant Effect Predictor*. Os dois *softwares* que efectuam a avaliação ao nível do *splicing*, são igualmente concordantes nos resultados, verificando-se que provoca a eliminação de dois locais de ligação aos *splicing enhancers motifs* SF2/ASF e SF2/ASF (IgM-BRCA1) e a eliminação de um *splicing silencer motif* (Tabela 12).

Os resultados obtidos pela análise *in silico* da mutação p.671_674 delRTTP, também são concordantes entre os *softwares*, e indicam que é uma variante da sequência codificante. Provoca a eliminação de três locais de ligação a *splicing enhancers motifs* SF2/ASF e SF2/ASF (IgM-BRCA1) e SRp40, eliminando ainda quatro ligações a *splicing silencer motif* (Tabela 12). Não foi possível, em tempo útil, realizar a análise destas alterações ao nível do RNA de modo a verificar a possibilidade de alteração do *splicing* e possível patogenicidade.

Ainda para estas duas mutações germinais, foi efectuado um estudo de segregação da alteração com a doença na família. Foi analisada a presença da alteração S630N no exão 6, num familiar afectado da família PH7, no entanto, não se verificou segregação da mutação com a doença uma vez que o familiar não apresentava esta alteração. No caso da mutação c.2013_2024del12, num estudo prévio tinham sido analisados dois familiares (um afectado e outro saudável), sendo que ambos revelaram ser portadores da mutação.

Tabela 12 – Resultados da análise *in silico* da consequência prevista das mutações germinais encontradas no gene *AXIN2*.

Mutação	SIFT	Polyphen	Human Splicing Finder		Ese Finder		Variant Effect Predictor (Ensembl)
			Splicing enhancer motifs	Splicing silencer motifs*	Criação	Eliminação	
c.1889 G>A	Tolerado	Benigno	Elimina: SF2/ASF; SF2/ASF (IgM-BRCA1)	Elimina: Um motivo 1	-	SF2/ASF; SF2/ASF (IgM-BRCA1)	Variante <i>missense</i>
c.2013_2024del12	-	-	Elimina: SF2/ASF (IgM-BRCA1); SF2/ASF; SRp40	Elimina: Quatro motivos 3	-	SF2/ASF (IgM-BRCA1); SF2/ASF; SRp40	Variante da sequência codificante

* - os números 1 e 3 são referentes ao número e sequência dos motivos: Motivo 1 – CTAGAGGT; Motivo 3 - TCTCCCAA

A análise dos resultados das várias variantes, nomeadamente das variantes polimórficas no Anexo 10, revelou também que havia amostras para as quais todas as variantes tinham sido detectadas em homozigotia, nomeadamente nas amostras: CA638 e A360 (pertencentes à mesma família), A462 e A983. Pelo contrário, duas das amostras (A468 e A686) não possuíam nenhuma destas alterações, i.e. apresentavam sempre homozigotia para o alelo normal. Na hipótese de que estas amostras pudessem apresentar uma deleção total ou parcial de um dos alelos do gene *AXIN2*, iniciou-se a análise mutacional das amostras de familiares destes indivíduos (afectados e não afectados) existentes no laboratório. Com esta finalidade, foram analisados apenas os exões que apresentavam variantes e foi efectuado um estudo de segregação destas com a doença na família (Tabela 13), i.e. avaliou-se se os familiares afectados também apresentavam sempre homozigotia, ou para as variantes, ou para o alelo normal. Se isto se verificasse, e os familiares saudáveis apresentassem heterozigotia para algumas variantes, então poder-se-ia estar na presença de uma deleção de vários exões, a qual seria muito provavelmente patogénica.

Dos nove familiares analisados para as cinco famílias, apenas cinco eram afectados (Anexo 11). Para a família PH4 foram analisados quatro familiares, sendo que apenas um era afectado. A amostra correspondente a este indivíduo (A1479) apresentou homozigotia para todas as variantes, da mesma forma que os dois indivíduos *proband* desta família, o que poderá traduzir uma grande deleção. Também a amostra A1600, correspondente a um dos indivíduos não afectados, apresentou o mesmo padrão. As restantes amostras apresentam algumas das variantes em heterozigotia, o que sugere que não apresentem qualquer grande deleção. Para a amostra A1508, foi ainda encontrada outra alteração no exão 4: c.1060-41 T>C, a qual apesar de estar descrita na base de dados NCBI como um SNV (rs149089442) pouco frequente [frequência de 1% para o alelo C (alelo variante) na população geral], uma vez que não foi detectada em mais nenhum familiar não parece ser relevante.

No caso da família PH6, o familiar analisado é afectado e apresenta todas as variantes em homozigotia (excepto no exão 1A que não foi analisado) tal como o *proband*, o que poderá traduzir a presença de uma grande deleção de um dos alelos.

Relativamente aos dois familiares das famílias PH7 e PH33 analisados, ambos afectados, estes, ao contrário dos *proband*, apresentavam algumas das

variantes em heterozigotia (Tabela 13) pelo que não poderão apresentar qualquer grande deleção. No caso da família PH33, verificou-se homozigotia apenas para as variantes dos exões 5 e 10.

Relativamente à família PH14, colocava-se a hipótese de uma eventual deleção germinal do exão 1A ao exão 4, tendo em conta a homozigotia para o alelo normal, a qual era rara na população estudada. A análise dos dois familiares confirmou a mesma homozigotia nos dois familiares.

Tabela 13 - Resultados da pesquisa de mutações germinais no gene *AXIN2* nas amostras de DNA de sangue periférico dos familiares dos casos *proband* que se revelaram homozigóticos para todas as variantes.

Família		Amostras	Afectado	Exão 1-Frag.A	Exão 4	Exão 5	Exão 10-Frag.C
PH4	<i>Proband</i> ¹	CA638S	Sim (ID 66A)	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
	<i>Proband</i> ¹	A360	Sim (ID 69A)	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
	Familiares	A1479	Sim (ID 70A)	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
		A1508	Não (44A)	Hom. 1 Hom. 2	Het. 1 Het. 2	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
		A1600	Não (51A)	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
		A1601	Não (65A)	Het. 1 Het. 2	Het. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
PH6	<i>Proband</i>	A462	Sim (ID 64A)	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
	Familiares	A1681	Sim (ID 35A)	NA	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
PH33	<i>Proband</i>	A983	Sim (ID 49A)	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
	Familiares	A1480	Sim (ID 50A)	Het. 1 Het. 2	Het. 1	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
PH7	<i>Proband</i>	A468	Sim (ID 50A)	Het. 1 Het. 2	N	Hom. 1 Hom. 2	Hom. 1
	Familiares	A1510	Sim (ID 47A)	Het. 2	Het. 3	Hom. 1 Het. 2 Het. 3	Het. 1
PH14	<i>Proband</i>	A686	Sim (ID 80A)	N	N	Het. 1	N
	Familiares	A1095	Sim (ID 42A)	N	N	Hom. 1 Het. 2	Het. 1
		A1331	Não (48A)	N	N	Hom. 1 Het. 2	Het. 1

¹ Na família PH4 foram analisados dois indivíduos como *proband* uma vez que foram diagnosticados em simultâneo; ID – Idade de diagnóstico; N – Normal (sem alteração); Het. – Heterozigótico; Hom. – Homozigótico; NA – não amplificado; **Exão 1A:** (1) c.1-409 G>C; (2) c.148 C>T (P50S); **Exão 4:** (1) c.1060-77 G>T; (2) c.1060-41 T>C; (3) c.1060-17 C>T; **Exão 5:** (1) c.1365 A>G (P455P); (2) c.1386 C>T (P462P); (3) c.1712+19 G>T; **Exão 10C:** (1) c.*1012 T>A

4.1.2. *BMPRIA*

Para o gene *BMPRIA* não foi possível concluir a análise de todos os fragmentos, não tendo sido possível analisar o exão 11 deste gene.

Foram detectadas cinco mutações germinais (Anexo 12 e Tabela 14), todas correspondendo a substituições de nucleótidos, uma do tipo *missense* (Figura 17) e quatro variantes intrônicas. Apresentam uma frequência variável entre 7% e 36%, nas amostras analisadas.

Tabela 14 – Mutações germinais detectadas no gene *BMPRIA*

Fragmento	Mutação germinal	Homo./Het.	Frequência das mutações nas amostras analisadas
Exão 1	c.4 C>A (P2T)	Heterozigotia	36%
Intrão 4	c.430+1 G>A	Heterozigotia	7%
	c.431-26 T>A	Heterozigotia	7%
Intrão 6	c.676-6 A>C	Heterozigotia	7%
Intrão 9	c.1343-11 T>C	Heterozigotia	36%

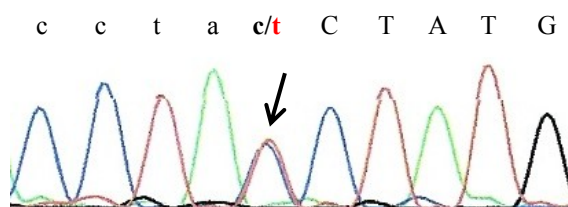


Figura 17 - Exemplo de uma das mutações (c.430+1 G>A) detectadas no gene *BMPRIA*; sequência *reverse* da amostra A1548.

As mutações estão descritas como SNV na base de dados NCBI (Tabela 15), com exceção da alteração c.430+1 G>A, da qual não há referência nas bases de dados.

Tabela 15 - Identificação e frequência alélica das mutações detectadas no gene *BMPRIA* de acordo com a base de dados NCBI.

Alteração	Identificação na base de dados SNP*	Frequência do alelo variante na população [#]
c.4 C>A	rs11528010	39% ¹
c.431-26 T>A	rs7920259	5% ²
c.676-6 A>C	rs186999445	0.05% ²
c.1343-11 T>C	rs7074064	29% ¹

* - Informação retirada da base de dados NCBI - dbSNP ; [#] - Informação retirada da base de dados NCBI – 1000 Genomes ; ¹ - Frequência do alelo variante na população ibérica; ² - Frequência do alelo variante na população geral

A elevada frequência das mutações c.4 C>A e c.1343-11 T>C revela que correspondem muito provavelmente a variantes polimórficas.

De modo a se avaliar a eventual patogenicidade das alterações menos frequentes, recorreu-se primeiramente à análise *in silico*. Tendo em conta a localização intrónica, foi avaliado apenas se estas alterações, assim como a c.430+1G>A, afectavam a ligação a factores de *splicing*. Para tal, recorreu-se aos *softwares Human Splicing Finder* e *Ese Finder* e ao *software Variant Effect Predictor* do *Ensembl* (Tabela 15).

Assim observou-se que a mutação c.430+1 G>A provoca a eliminação de três locais de ligação aos *splicing enhancer motifs* SRp40, SF2/ASF (IgM-BRCA1) e SF2/ASF (Tabela 15), sendo que este resultado é concordante nos dois *softwares* utilizados. No entanto, o *ESE Finder* demonstrou ainda, que esta mutação provoca a eliminação de um sítio dador de *splicing* e a inserção de um *branch site*. Não foram obtidos quaisquer resultados para estes parâmetros, através do *Human Splicing Finder*. Apesar disso, os resultados do *ESE Finder* corroboram os obtidos no *Variant Effect Predictor* do *Ensembl*, de que esta mutação é uma variante do sítio dador de *splicing* (Tabela 16).

A análise da mutação c.431-26 T>A utilizando o *software Variant Effect Predictor* classificou esta mutação como uma variante intrónica. Os outros *softwares* utilizados não mostraram resultados. Apenas o *Human Splicing Finder* apresenta como resultado desta mutação a inserção de um novo local de ligação a um *splicing enhancer motif* (9G8), o qual é praticamente desconhecido até ao momento.

Relativamente à mutação c.676-6 A>C, foi classificada como uma variante da região de *splicing*/variante intrónica, pelo *software Variant Effect Predictor*. Os restantes *softwares* são concordantes nos resultados, observando-se que esta mutação provoca a inserção de um local de ligação ao *splicing enhancer motif* SRp40, e a inserção de dois locais de ligação a *splicing silencer motifs* (Tabela 16).

De modo a se confirmar uma possível patogenicidade, no caso destas mutações, é necessária a análise do RNA de modo a avaliar a existência de um transcrito alternativo gerado pelo *splicing* aberrante, isto é, da retenção de intrões ou deleção de um ou mais exões. Apenas foi possível analisar a amostra A1548 com a alteração c.430+1 G>A, uma vez que não havia RNA disponível das restantes amostras (Figura 18).

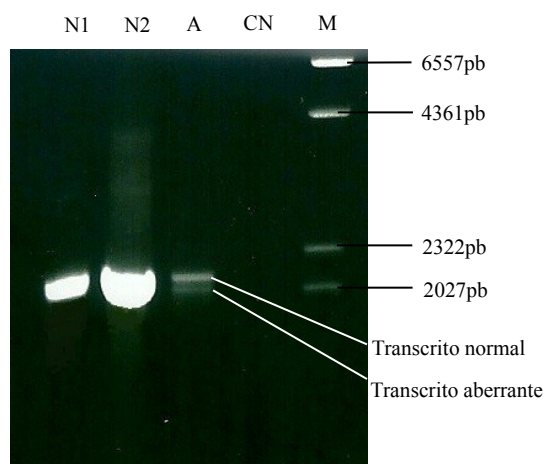


Figura 18 - Resultado obtido através da amplificação do cDNA compreendendo um fragmento de 2138 pb entre os exões 1 e 11, para a amostra A1548; Legenda: N1 – controlo normal 1; N2 – controlo normal 2; A – amostra A1548; CN – controlo negativo; M – marcador Lambda/HindIII (*Fermentas*).

A amplificação do cDNA compreendendo um fragmento de 2138 pb entre os exões 1 e 11, para a amostra A1548, revelou a existência de uma banda correspondente ao transcrito normal e uma outra, de menor peso molecular, correspondente a um transcrito aberrante. Não foi possível realizar a sequenciação do transcrito em tempo útil.

Não existia material biológico de qualquer familiar dos indivíduos que apresentavam mutação no *BMPRIA* pelo que não foi efectuada análise de segregação com a doença na família.

Tabela 16 - Resultados da análise *in silico* da consequência prevista das mutações germinais no gene *BMPRIA*.

Mutação	<i>Human Splicing Finder</i>		<i>Ese Finder</i>		<i>Variant Effect Predictor (Ensembl)</i>
	<i>Splicing enhancer motifs</i>	<i>Splicing silencer motifs*</i>	Criação	Eliminação	
c.430+1 G>A	Elimina: SRp40; SF2/ASF (IgM-BRCA1); SF2/ASF	Elimina: Um motivo 1; Um motivo 2 Insere: Um motivo 2	<i>Branch site</i>	Sítio dador de <i>splicing</i> SRp40; SF2/ASF (IgM-BRCA1); SF2/ASF	Variante do sítio dador de <i>splicing</i>
c.431-26 T>A	-	-	-	-	Variante intrónica
c.676-6 A>C	Insere: SRp40	Insere: Dois motivos 3	-	SRp40	Variante da região de <i>splicing</i> / Variante intrónica

* - os números 1, 2 e 3 são referentes ao número de motivos: Motivo 1 – CTAGAGGT; Motivo 2 – [T/G]G[T/A]GGGG; Motivo 3 - TCTCCCAA

4.1.3. *MGMT*

Para o gene *MGMT* não foi possível concluir a análise de todos os fragmentos, pelo que são apresentados os resultados para apenas quatro dos seis fragmentos (exões 2, 3, 4 e 5B) (Anexo 13). A amostra A187 não foi analisada, uma vez que esta amostra não amplificou para nenhum dos fragmentos.

Foram encontradas duas mutações pontuais germinais no exão 3, c.252 C>T (p.Leu84Leu) e c.343 C>T (p.Leu115Phe), esta última do tipo *missense*, e ambas com uma frequência de 36% (Tabela 17).

Tabela 17 – Identificação das mutações detectadas no gene *MGMT* e respectiva frequência nas amostras analisadas.

Fragmento	Mutação germinal	Homo./Het.	Frequência das mutações nas amostras analisadas
Exão 3	c.252 C>T (L84L)	Heterozigotia	36%
	c.343 C>T (L115F)	Heterozigotia	36%

As duas alterações estão descritas como SNV, na base de dados dbSNP no NCBI (Tabela 18).

Tabela 18 - Identificação e frequência alélica das variantes detectadas no gene *MGMT* de acordo com a base de dados NCBI.

Alteração	Identificação base de dados SNP*	Frequência do alelo variante na população ibérica [#]
c.252 C>T (L84L)	rs1803965	11%
c.343 C>T (L115F)	rs12917	11%

* - Informação retirada da base de dados NCBI - dbSNP ; [#] - Informação retirada da base de dados NCBI – 1000 Genomes.

As mutações encontradas apresentam uma frequência na população ibérica sugestiva de uma variante polimórfica. No entanto, estas mutações foram detectadas em associação, em cada um dos indivíduos, e as respectivas famílias apresentavam características fenotípicas, e um padrão molecular nas respectivas lesões, semelhantes (Silva et al., submetido para publicação). Assim, para avaliar qualquer possível efeito patogénico, realizou-se uma análise *in silico* da mutação *missense* c.343 C>T (L115F). Para tal, recorreu-se aos *softwares* *Variant Effect Predictor*,

SIFT e *Polyphen*. Os resultados foram ambíguos, uma vez que, dependendo dos *softwares*, foi considerada uma mutação tolerada (*SIFT*) ou uma mutação possivelmente patogénica (*Polyphen*). Em termos de uma possível influência desta alteração no processo de *splicing*, apenas o *software Human Splicing Finder* indicou a eventual criação de um local de ligação a um *splicing silencer motif* (motivo 3 - TCTCCCAA). No que diz respeito à mutação silenciosa (L84L), o mesmo *software* revelou que esta mutação poderá criar um novo local de ligação a um *splicing silencer motif* (motivo 2 – [T/G]G[T/A]GGGG).

Para avaliar qualquer possível influência na susceptibilidade para a doença nas famílias estudadas efectuou-se análise de segregação, no entanto, esta só foi possível efectuar na família PH4, uma vez que nos restantes casos não se dispunha de material biológico dos familiares. Assim, de modo a averiguar se estas alterações segregam com a doença nos familiares dos indivíduos em estudo respeitantes à família PH4, foi efectuada a análise de mutações no exão 3 nesses familiares. Nos resultados obtidos (Tabela 19), observou-se que todos os familiares (à excepção do A1508 (não afectado), que não expressa nenhuma alteração), apresentam as mesmas mutações que o indivíduo *proband*, em heterozigotia.

Tabela 19 - Resultados da pesquisa de mutações germinais no exão 3 do gene *MGMT* nas amostras dos familiares da família PH4.

Família	Amostras	Afectado	Exão 3
PH4	<i>Proband</i> ¹	CA638S	Sim (ID 66A)
			Het. 1 Het. 2
	<i>Proband</i> ¹	A360	Sim (ID 69A)
			Het. 1 Het. 2
		A1479	Sim (ID 69A)
			Het. 1 Het. 2
	Familiares	A1508	Não (44A)
		A1600	Não (51A)
		A1601	Não (65A)
			Het. 1 Het. 2

¹ Na família PH4 foram analisados dois indivíduos como *proband* uma vez que foram diagnosticados quase em simultâneo; N – Normal (sem alteração); Het. – Heterozigotia; **Exão 3:** (1) c.252 C>T (L84L); (2) c.343 C>T (L115F).

4.2. Análise de perda de heterozigotia do gene *MGMT*

Para se avaliar a possibilidade de existência de LOH no gene *MGMT*, no cromossoma 10, que combinada com a metilação neste gene contribuisse para a tumorigénese na PS, analisaram-se os marcadores D10S1676, D10S1651 e D10S169, flanqueadores do gene.

Verificou-se a existência de LOH (Figura 19) em pelo menos um dos marcadores analisados, em 13/47 (28%) das lesões analisadas, como se pode observar na Tabela 20.

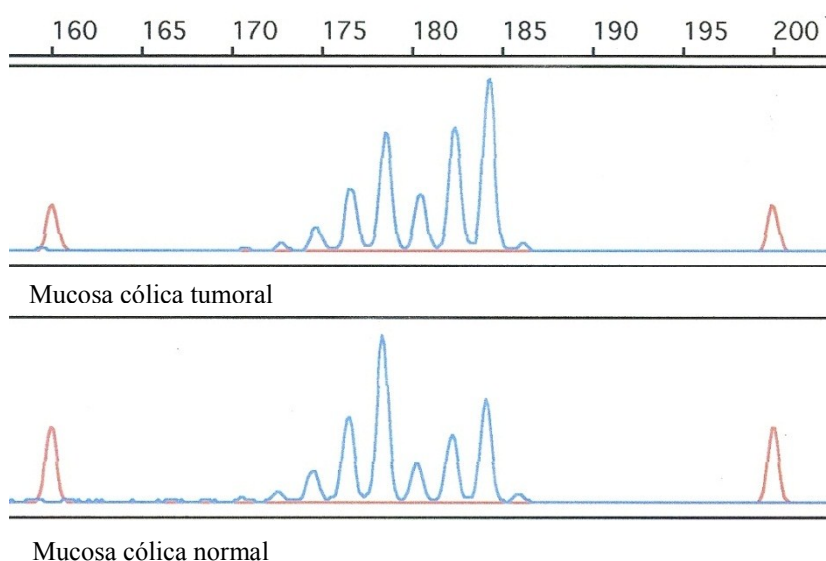


Figura 19 - Electroforectograma representativo de uma lesão de PS que apresenta perda de heterozigotia (LOH) do alelo de menor peso molecular, para o marcador D10S1651

Tabela 20 – Resultados da análise de perda de heterozigotia (LOH) no gene *MGMT*

Família	DNA normal	DNA tumoral	Marcadores		
Localização preferencial das lesões: proximal/todo o cólon			D10S1676	D10S1651	D10S169
PH1	A187	A756 AS	LOH	NA	NA
		A756 AT1	NA	NA	NA
		A756 AT2	NA	NA	NA
		A756 PH1	N	LOH	NA
		A756 PH2	I	I	NA
PH3	A755	A755 AS1	NI	NI	NA
		A755 AS2	NI	NI	NA
		A755 AS3	NI	NI	NA
		A755 PH1	NI	NI	LOH
		A755 PH2	NI	NI	I

Continuação da tabela na pág. 65

PH4	CA638S	CA638 AS	NI	N	NA
		CA638 C	NI	N	NA
	A360/CA636	CA636 AT1	NI	LOH	NI
		CA636 C	NI	LOH	NI
		CA636 AT2	NI	LOH	NI
		CA636 AT3	NI	LOH	NI
		CA636 ATV	NI	I	NI
PH5	A193	A193 AT	NA	NA	NI
		A193 ATV	LOH	LOH	NI
		A193 C	N	I	NI
		A193 PH1	N	LOH	NI
		A193 PH2	N	LOH	NI
PH7	A468/CA656	A759T/CA655	IC	I	I
PH8	A643/A760	A643 PA	N	NI	-
		A643 PB	N	NI	-
		A760 AS1	NA	NI	-
		A760 PH1	NA	NI	-
		A760 PH2	N	NI	LOH
		A760 PH3	LOH	NI	-
		A760 PH4	LOH	I	N
		A760 PH5	N	NI	-
		A760 PH6	-	NI	-
Localização preferencial das lesões: distal					
PH6	A462/A478	A478 PG	N	N	-
		A478 PH	N	N	-
		A478 P3	N	N	-
		A462 PH1	-	N	-
		A462 PH2	I	N	-
PH12	A758	A758 C	N	N	-
PH14	A686	A686 P1A	NI	-	-
		A686 P2B	NI	N	-
		A686 P3C	NI	-	-
		A686 P4D	NI	N	-
		A686 P5E	NI	-	-
PH33	A983	A983 PA	N	N	-
		A983 PB	N	-	-
		A983 PC	N	-	-
		A983 PD	N	-	-

N – normal (sem perda de heterozigotia); LOH – perda de heterozigotia; I – instabilidade de microssatélites; NI – não informativo (devido a homozigotia); IC – inconclusivo; NA – não amplificou; - não realizado; O gene *MGMT* situa-se entre os marcadores D10S1676 e D10S1651.

Pela análise dos resultados, verificou-se que as amostras informativas (foram consideradas amostras informativas, todas as que apresentavam pelo menos um resultado normal ou de LOH), de DNA das lesões dos indivíduos com localização preferencial das lesões no cólon proximal/todo o cólon, apresentavam uma maior percentagem de perdas de heterozigotia (13/18 – 72%), em comparação com as

amostras das lesões dos indivíduos que apresentam uma localização preferencial das lesões no cólon distal (0/12 – 0%). Estas últimas, geralmente não apresentavam perda de heterozigotia (sendo normais), ou então a LOH não podia ser avaliada, porque eram não informativas (Figura 20), ou ainda inconclusivas para perda de heterozigotia (por serem instáveis). Por a LOH não parecer um evento frequente nas amostras da metade inferior da tabela [apesar da análise não ter sido efectuada para o marcador D10S169, a análise dos marcadores D101676 e D10S1651, nas amostras da metade superior da tabela permite identificar frequentemente a LOH] e por questões técnicas, o estudo foi direccionado preferencialmente para as amostras dos indivíduos com localização preferencial das lesões no cólon proximal/todo o cólon (metade superior da tabela).

De um modo geral, as amostras dos doentes das famílias PH1, PH4, PH5, e PH8, apresentam pelo menos um marcador com perda de heterozigotia.

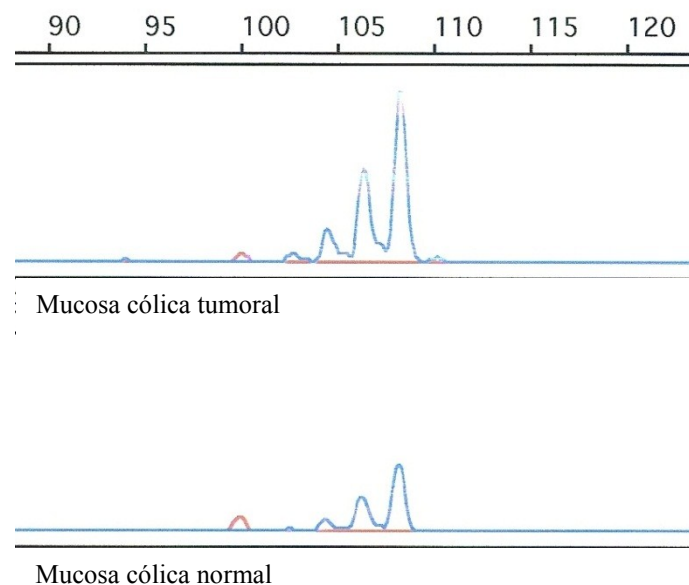


Figura 20 - Electroforectograma representativo de uma amostra homozigótica para o marcador D10S169

5. Discussão

A PS é uma doença rara, que se inclui nos síndromes hereditários de CCR associados a polipose, para a qual ainda não existe uma causa molecular conhecida.

Neste estudo efectuou-se a pesquisa de mutações germinais em três genes candidatos para a susceptibilidade para PS (*AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*), para os quais, se tinham encontrado, em estudos prévios, alterações moleculares (somáticas ou germinais) que tornam estes genes, candidatos para a susceptibilidade de desenvolvimento de PS. Foi ainda analisada a perda de heterozigotia (LOH) do locus do gene *MGMT* localizado no cromossoma 10, de modo a melhorar a caracterização do processo de tumorigénese envolvido na PS. Com este estudo, pretendeu-se avaliar se a LOH (evento somático), ou a existência de mutações germinais neste gene, quando aliados à metilação do *MGMT* (evento somático), seriam um dos dois eventos necessários para a progressão tumoral no contexto de PS.

A análise mutacional dos genes *AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*, permitiu a identificação de um total de 21 mutações: 1 mutação na região 5'UTR, 4 mutações *missense*, 3 mutações silenciosas, 11 mutações intrónicas e 2 mutações localizadas na região 3'UTR.

Relativamente ao gene *AXIN2*, as mutações c.1-409 G>C, c.148 C>T, c.1060-77 G>T, c.1060-17 C>T, c.1060-287 A>G, c.1060-282 A>G, c.1060-254 A>G, c.1365 A>G, c.1386 C>T, c.1712+19 G>C, c.*794 C>A, e c.*1012 T>A, encontram-se descritas como variantes polimórficas, mais concretamente como SNV (NCBI). No entanto, na literatura, alguns destes SNV encontram-se descritos como associados a determinadas doenças, mas ainda sem qualquer associação a CCR. Alguns estudos demonstraram que a alteração c.148 C>T (P50S) está associada a doenças como a oligondontia (Callahan et al., 2010) e a um menor risco de cancro do pulmão (Gunes, 2010). No entanto, não foram encontradas evidências que associem este SNV a CCR (Gunes, 2010). Um estudo realizado por Gunes et al., 2010, comprovou que doentes de uma população turca com astrocitomas (tumor cerebral) e que eram portadores do SNV c.1386 C>T (P462P) (genótipo TT), tinham um maior risco de desenvolverem esse tipo de tumor, quando comparados com os indivíduos controlo portadores do genótipo CC (Gunes et al., 2010).

O facto destas variantes polimórficas não terem sido associadas até ao momento a CCR e o facto de possuírem uma frequência bastante elevada na população ibérica

ou geral (quando não havia dados relativos à população ibérica), e também nas amostras analisadas, tendo em conta a história familiar marcada apresentada por algumas famílias de PS, sugere que não estejam envolvidas na susceptibilidade para esta doença.

No entanto, apesar destes SNV não parecerem estar associados a PS, não se pode descartar a hipótese de que a combinação de alguns destes polimorfismos – ou seja, um determinado haplótipo - possa conferir risco para CCR. Para se comprovar tal facto, são necessários estudos alargados ao genoma de centenas de indivíduos normais (*Genome-Wide Studies*).

No que diz respeito às duas mutações potencialmente patogénicas no gene *AXIN2*, a mutação c.1889 G>A (S630N) ainda não se encontra descrita nas bases de dados, nem na literatura, pelo que se tenha recorrido a uma análise *in silico*. Os resultados da análise pelo *SIFT* e *Polyphen* baseados na conservação do aminoácido sugerem que a substituição é tolerada, não parecendo por isso ter um significado patogénico. No entanto, esta mutação envolve a substituição de um resíduo de serina o qual é fosforilado (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y2T1>). A fosforilação da *AXIN2* torna-se importante na formação do complexo que medeia a fosforilação da β -catenina e a sua marcação para degradação pelo proteossoma. Se esta não for degradada, conduz à activação de genes alvo envolvidos na tumorigénese, pelo que a substituição desta serina e, consequentemente, uma eventual diminuição da fosforilação desta proteína, poderá contribuir para a tumorigénese. Adicionalmente, a mutação encontra-se no domínio de ligação à proteína PP2Ac. Esta proteína é uma serina/treonina fosfatase, envolvida na sinalização intracelular, na regulação dos genes e na progressão do ciclo celular (Ratcliffe et al., 2000). As suas subunidades ligam-se às proteínas *AXIN2* e *APC* (Ratcliffe et al., 2000), de maneira que a existência de uma mutação no domínio de ligação à PP2Ac no gene *AXIN2*, pode eventualmente provocar alterações na ligação destas proteínas, alterando os processos celulares em que estão envolvidas.

Tendo em conta o acima descrito, a baixa frequência com que foi detectada nas amostras analisadas (1/12 indivíduos), assim como os resultados obtidos no *Human Splicing Finder* e no *ESE Finder*, que revelam que esta mutação poderá também provocar alterações nos locais de ligação a factores de *splicing*, pode-se sugerir que a hipótese de ser patogénica não pode ser excluída. Será necessária a

análise da expressão do RNA para averiguar a existência de transcritos aberrantes, assim como estudos funcionais.

Contudo, a análise de segregação da mutação S630N com a doença demonstrou que o familiar analisado (A1510), que é afectado, e com idade superior a 50 anos, não é portador desta mutação. Mas, uma vez que o indivíduo A1510 foi diagnosticado aos 47 anos e, até aos 56 desenvolveu apenas 8 pólipos, não se pode excluir que a mutação S630N não possa contribuir para um maior risco de desenvolvimento de pólipos no *proband*, o qual foi diagnosticado aos 50 anos com cerca de 50-100 pólipos.

No caso da outra mutação potencialmente patogénica no gene *AXIN2* (c.2013_2024del12), encontrada na amostra A686 em homozigotia num estudo prévio, o facto de ter sido detectada em heterozigotia numa filha que é também afectada, com idade inferior a 50 anos, apesar de uma outra filha também portadora da mutação, ser saudável aos 48 anos, e tendo em conta a idade de diagnóstico do *proband* (80 anos), não exclui a segregação da mutação com a doença. Esta mutação encontra-se no domínio de ligação à proteína PP2Ac, sendo este mais um facto que favorece a patogenicidade. Também a análise *in silico* corrobora essa hipótese, uma vez que demonstrou que a mutação provoca alterações ao nível da ligação de factores de *splicing*. No entanto, este resultado carece ainda de comprovação através da análise de expressão do RNA.

Relativamente à existência de uma eventual deleção do gene devido à presença, para determinadas amostras, de todas as variantes em homozigotia, a análise de segregação da referida homozigotia revelou resultados potencialmente positivos em alguns casos. No caso da família PH4 foram analisados quatro familiares, sendo que apenas um era afectado. A amostra correspondente a este indivíduo (A1479) apresentou homozigotia para todas as variantes, da mesma forma que os dois indivíduos *proband* desta família, o que poderá traduzir uma grande deleção. Também a amostra A1600, correspondente a um dos indivíduos não afectados, apresentou o mesmo padrão, no entanto, tendo em conta a idade de diagnóstico dos indivíduos afectados desta família, não se pode excluir que este indivíduo não possa vir a ser afectado numa idade mais avançada. As restantes amostras (A1508 e A1601) apresentam algumas das variantes em heterozigotia, o que sugere que não apresentem qualquer grande deleção, e está de acordo com o facto de não serem afectadas, no entanto, de acordo com a idade dos doentes não se

pode excluir que algum não possa vir a ser afectado. Assim, nesta família, esta análise de segregação não é conclusiva. Da mesma forma, na família PH14, apesar de um dos familiares não ser afectado e apresentar o mesmo padrão de homozigotia para os exões 1 e 4 que o *proband*, tendo em conta a idade de diagnóstico tardia do *proband*, isso não exclui a segregação de uma eventual deleção, que compreenda os exões 1-4, com a doença na família.

Relativamente à família PH6, o facto do familiar analisado (A1681) ser afectado e apresentar todas as alterações em homozigotia, sugere que a ocorrência de uma deleção de um dos alelos que contribua para a susceptibilidade para PS, é uma possibilidade. No entanto, será necessário estudar mais familiares, assim como avaliar a existência de grande deleção por outra técnica, como a análise do número de cópias por PCR *real time*. Já o familiar da família PH33 analisado (A1480) só apresenta as mutações em homozigotia a partir do exão 5, e por esse motivo não se pode excluir a hipótese da existência de uma deleção parcial de um dos alelos, apenas nesta região. Uma vez que este familiar é afectado, coloca-se a mesma hipótese referida para a família PH6.

Quanto à família PH7, o facto do familiar analisado ser afectado e, ao contrário do *proband*, apresentar algumas das variantes em heterozigotia (Tabela 13), permite excluir a presença de uma grande deleção na família, uma vez que a homozigotia não parece segregar com a doença.

No gene *BMPRIA* foram encontradas: 1 mutação *missense* e 4 mutações intrónicas, uma delas do sítio de *splicing*.

Duas das mutações foram detectadas com uma frequência elevada na população em geral, pelo que não deverão ser patogénicas. A mutação c.4 C>A (P2T) não parece ser patogénica, uma vez que se encontra descrita como sendo SNV, possui uma frequência relativamente alta, e porque a análise *in silico* demonstrou que é uma alteração tolerada. Já a alteração c.1343-11 T>C, também descrita como SNV, é encontrada com bastante frequência nos indivíduos analisados (5/14 - 36%), possuindo também uma frequência alta na população ibérica (29%), excluindo-se assim a hipótese de ser patogénica e, de estar relacionada com a susceptibilidade para PS.

As restantes 3 mutações merecem ser investigadas quanto à sua patogenicidade. O facto de a mutação c.430+1 G>A se encontrar no 1º nucleótido do

intrão 4, no sítio dador de *splicing*, de ter uma frequência muito baixa nas amostras analisadas (1/14 - 7%), não tendo sido descrita até ao momento na população em geral, e de acordo com a análise *in silico* provocar a eliminação do sítio dador de *splicing*, assim como alterações nos locais de ligação aos factores de *splicing*, sugere fortemente que esta mutação pode ser patogénica. A análise do RNA da amostra que expressava esta mutação, demonstrou que existe realmente a presença de um transcrito aberrante. No entanto, é ainda necessário confirmar esta mutação através da sequenciação do transcrito. Esta mutação foi encontrada numa amostra de um doente com polipose juvenil, o que está de acordo com o envolvimento de mutações neste gene na susceptibilidade para a polipose juvenil. É de salientar que este indivíduo para além de pólipos juvenis também apresenta pólipos serrados.

A alteração c.431-26 T>A também foi encontrada numa amostra de um doente com polipose juvenil, que tal como o anterior, também apresentava pólipos serrados. Apresenta uma frequência relativamente baixa, tanto nos indivíduos analisados (7%) como na população geral (5%), não parecendo provocar alterações em locais de ligação a factores de *splicing*. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de ser uma mutação patogénica e deverá ser analisada a expressão do RNA de modo a averiguar a existência ou não de um transcrito aberrante.

Relativamente à mutação c.676-6 A>C, apesar de estar descrita como SNV, tem uma frequência muito baixa, nas amostras analisadas neste estudo (7%), sendo ainda mais baixa na população geral (0.05%), e provoca alterações nas ligações a factores de *splicing*, pelo que poderá ser uma mutação patogénica e deverá também ser investigada ao nível do RNA.

Relativamente ao gene *MGMT*, detectaram-se apenas duas mutações, apesar da análise mutacional ainda não estar concluída. A alteração c.343 C>T encontra-se descrita na literatura como sendo uma variação genética associada a um maior risco de desenvolvimento de linfomas não-Hodgkin, quando associada a uma exposição ocupacional a solventes clorados (Jiao et al., 2012). De acordo com os resultados do *software SIFT*, e dada a frequência relativamente alta nas amostras analisadas (36%), bem como o facto de estar descrita como sendo um SNV (NCBI), sugere-se que esta mutação por si só não deve ser patogénica no contexto de PS. No entanto, como o resultado do *software Polyphen* sugere que é uma mutação possivelmente prejudicial,

não se pode excluir a possibilidade desta contribuir para a susceptibilidade para CCR.

No que diz respeito à mutação c.252 C>T, esta também se encontra descrita como sendo SNV (NCBI), e é uma mutação silenciosa (L84L), uma vez que não provoca alteração de aminoácido. No entanto, apesar desta variante conferir à proteína uma actividade e propriedades físico-químicas similares às da proteína *wild-type*, foi associada ao aumento do risco de cancro da mama em mulheres portadoras da variante alélica -T e que são fumadoras crónicas (que fumam à mais de 31 anos) (Shen et al., 2005). Contudo não existem ainda registos que associem esta alteração a CCR. Desta maneira, e também porque a frequência desta mutação nas amostras analisadas é relativamente elevada (4/12 - 36%), sugere-se que esta alteração por si só não deva ser patogénica no contexto de PS.

No entanto, é de salientar que as duas mutações encontradas, encontram-se presentes em combinação nos mesmos indivíduos, i.e., apenas nas amostras CA638 e A360, pertencentes a indivíduos da mesma família, assim como nas amostras A193 e A757. Deste modo, apesar da sua elevada frequência não se pode excluir que a associação das duas possa conferir algum risco para o desenvolvimento de PS. Em alternativa, a co-existência das duas mutações deve-se apenas ao facto de estarem em *cis* no mesmo cromossoma.

A análise de segregação das duas mutações com a doença na família PH4 não foi conclusiva, uma vez que os indivíduos A1600 e A1601 não são afectados, mas apresentam estas alterações. No entanto, tendo em conta a idade dos mesmos e a idade de diagnóstico nesta família, não se pode excluir que possam vir ainda a ser afectados.

Assim, tendo em conta a frequente metilação do *MGMT* em lesões de PS, encontrada num estudo prévio do grupo de Gastrenterologia da UIPM (Silva et al., submetido para publicação) (Tabela 21), não se pode ainda excluir o envolvimento de mutações germinais neste gene na inactivação do outro alelo do gene.

Por outro lado, uma eventual perda de heterozigotia (LOH) no mesmo gene, nas amostras com metilação, poderá sugerir que possivelmente, estes dois eventos sejam os necessários para a iniciação tumoral no contexto de PS. Desta maneira, os resultados obtidos no presente trabalho foram correlacionados com os resultados de metilação e instabilidade de microssatélites, obtidos em estudos prévios, para as mesmas amostras (Silva et al., submetido para publicação) (Tabela 21).

Tabela 21 - Resultados dos estudos de instabilidade de microssatélites e metilação do gene *MGMT* juntamente com resultados da análise de LOH neste gene.

Família	DNA normal	DNA tumoral	MSS	Metilação	Marcadores		
Localização preferencial das lesões: proximal/todo o cólon		D10S1676			D10S1651	D10S169	
PH1	A187	A756 AS	MSS**	HM (34%)	LOH	NA	NA
		A756 AT1	MSS**	HM (22%)	NA	NA	NA
		A756 AT2	MSS**	NM (7%)	NA	NA	NA
		A756 PH1	MSS**	HM (24%)	N	LOH	NA
		A756 PH2	MSS**	HM (19%)	I	I	NA
PH3	A755	A755 AS1	MSI-H	-	NI	NI	NA
		A755 AS2	MSI-L	HM (19%)	NI	NI	NA
		A755 AS3	MSI-H	NM (2%)	NI	NI	NA
		A755 PH1	MSI-L	HM (35%)	NI	NI	LOH
		A755 PH2	MSI-L	NM (10%)	NI	NI	I
PH4	CA638S	CA638 AS	MSS	HM (37%)	NI	N	NA
		CA638 C	MSS	HM (40%)	NI	N	NA
	A360/CA636	CA636 AT1	MSI-L	HM (15%)	NI	LOH	NI
		CA636 C	MSS	HM (29%)	NI	LOH	NI
		CA636 AT2	MSI-L	NM (6%)	NI	LOH	NI
		CA636 AT3	MSS	HM (16%)	NI	LOH	NI
		CA636 ATV	MSI-H	HM (29%)	NI	I	NI
PH5	A193	A193 AT	MSI-L	HM (23%)	NA	NA	NI
		A193 ATV	MSS	HM (46%)	LOH	LOH	NI
		A193 C	MSS	HM (25%)	N	I	NI
		A193 PH1	MSS	HM (23%)	N	LOH	NI
		A193 PH2	MSS	HM (24%)	N	LOH	NI
PH7	A468/CA656	A759T/CA655	MSI-H	NM (10%)	IC	I	I
PH8	A643/A760	A643 PA	MSS	HM (28%)	N	NI	-
		A643 PB	MSS	HM (17%)	N	NI	-
		A760 AS1	MSS**	-	NA	NI	-
		A760 PH1	MSI-L	NM (0%)	NA	NI	-
		A760 PH2	MSI-H	-	N	NI	LOH
		A760 PH3	MSI-L	NM (12%)	LOH	NI	-
		A760 PH4	MSI-L	NM (0%)	LOH	I	N
		A760 PH5	MSI-L	NM (9%)	N	NI	-
		A760 PH6	MSS	NM (0%)	-	NI	-
Localização preferencial das lesões: distal							
PH6	A462/A478	A478 PG	MSS	HM (16%)	N	N	-
		A478 PH	MSS	NM (5%)	N	N	-
		A478 P3	MSS**	NM (2%)	N	N	-
		A462 PH1	MSS	HM (45%)	-	N	-
		A462 PH2	MSS	HM (26%)	I	N	-
PH12	A758	A758 C	MSI-L	HM (26%)	N	N	-
PH14	A686	A686 P1A	MSS	NM (9%)	NI	-	-
		A686 P2B	MSS	HM (15%)	NI	N	-
		A686 P3C	MSS	NM (9%)	NI	-	-
		A686 P4D	MSS	NM (13%)	NI	N	-
		A686 P5E	MSS	-	NI	-	-
PH33	A983	A983 PA	MSS*	NM (8%)	N	N	-
		A983 PB	MSS*	NM (12%)	N	-	-

Continuação da tabela na pág. 74

A983 PC	MSS*	NM (10%)	N	-	-
A983 PD	MSS*	NM (8%)	N	-	-

N – normal (sem perda de heterozigotia); MSS – microssatélites estáveis; MSI-L – instabilidade de microssatélites de baixo grau; MSI-H – instabilidade de microssatélites de alto grau; NM – não metilado; HM – hipermetilado; LOH – perda de heterozigotia; I – instabilidade de microssatélites; NI – não informativo (devido a homozigotia); IC – inconclusivo; NA – não amplificou; - não realizado; * - apenas foi realizado o marcador BAT26, por falta de tecido tumoral; ** - o marcador D2S123 não foi realizado

Constatou-se que quase todas as amostras que apresentam LOH, possuem também metilação no *MGMT*, e o facto de se ter encontrado LOH em PH (exemplo: amostra A193PH1), que são lesões muito precoces, e em adenomas tubulares, mas também em amostras de lesões tardias, como é o caso de adenocarcinomas (exemplo: amostra CA636C), corrobora a hipótese de que a LOH e a metilação podem estar associadas à iniciação tumoral de PS e que são seleccionadas durante a progressão tumoral.

No caso das amostras CA636AT2, A760PH3 e A760PH4, constatou-se que estas possuíam perda de um dos alelos, mas não apresentavam metilação. No entanto, uma vez que são lesões precoces – PH e AT, podem ainda não ter adquirido um 2º evento no *MGMT*, que neste caso poderia ser a metilação.

As amostras A755PH1 e A760PH2 possuem LOH no marcador D10S169, sendo não informativas para o marcador D10S1651, e portanto não se pode excluir a hipótese de que também haja LOH para este. Uma vez que o D10S1651 se encontra muito próximo do *MGMT*, uma perda neste marcador, poderá implicar uma eventual perda no gene. No entanto, são necessários estudos adicionais para se comprovar a existência de LOH no *MGMT* para estes casos, como por exemplo através de MS-MPLA (*Methylation specific – multiplex ligation-dependent probe amplification*).

Quanto à amostra A759T para o marcador D10S1676, para a qual se obteve um resultado inconclusivo (instabilidade ou perda), o mais provável é que seja uma amostra com instabilidade, uma vez que para o marcador D10S1651 esta amostra apresentou instabilidade. Outro facto que corrobora essa hipótese é o resultado obtido em estudos prévios, para os marcadores de Bethesda, em que se verificou que a amostra A759T é MSI-H.

Relativamente às amostras dos indivíduos com localização preferencial das lesões no cólon distal estas não apresentam LOH, e apenas 5/12 (42%) amostras

informativas analisadas (foram consideradas amostras informativas, todas as que apresentavam pelo menos um resultado normal ou de LOH), apresentam metilação, pelo que parecem ter um padrão mutacional diferente consoante a localização preferencial das lesões, o que sugere diferentes etiologias. No entanto, são necessários estudos adicionais para se comprovarem estas hipóteses, sendo importante a análise de mais marcadores de microssatélites flanqueadores do gene *MGMT*, bem como o estudo de mais amostras.

Quanto à hipótese de que os dois eventos que causam susceptibilidade para PS possam ser um evento somático – LOH ou metilação, combinado com um evento germinal – mutações germinais no gene *MGMT*, os resultados obtidos até ao momento, tal como referido atrás, não são ainda conclusivos. Relacionando os resultados de LOH e da análise mutacional do gene *MGMT*, obtidos no presente trabalho, constatou-se que as mutações germinais encontradas neste gene, não estarão envolvidas no processo de iniciação tumoral de PS. As amostras nas quais foram encontradas mutações germinais no *MGMT*, apesar da patogenicidade destas ser desconhecida, exibem LOH e metilação (exemplo: amostras tumorais correspondentes ao DNA normal A360 e A193), mas o mesmo acontece com outras amostras em que não foram detectadas mutações germinais. Será necessário por isso, completar a análise de mutações germinais, assim como de LOH.

6. Conclusão

Nos últimos anos têm vindo a ser caracterizadas algumas alterações genéticas envolvidas no processo de tumorigénese no contexto da PS. Perante evidências de que existe um aumento do risco de CCR nos familiares de indivíduos com PS, foi proposta a existência de formas familiares de polipose serreada. No entanto, a base genética que leva à susceptibilidade para o desenvolvimento de PS não é ainda conhecida.

Neste trabalho, a pesquisa de mutações germinais em três genes candidatos para a susceptibilidade para PS (*AXIN2*, *BMPRIA* e *MGMT*), permitiu a identificação de cinco mutações potencialmente patogénicas de acordo com a análise *in silico* e/ou com a análise de segregação da mutação com a doença: duas no gene *AXIN2* e três no gene *BMPRIA*. No caso do gene *AXIN2*, as mutações S630N e 671_674delRTTP poderão alterar a fosforilação da proteína, necessária para a sua função de regulação dos níveis intra-celulares de β -catenina, críticos para a função normal da célula epitelial. No entanto, serão necessários estudos adicionais para confirmar a sua patogenicidade e associação à susceptibilidade para o desenvolvimento de PS. Será necessário estudar mais familiares para concluir quanto à segregação com a doença e, realizar estudos funcionais que permitam avaliar o efeito das mesmas, em processos celulares envolvidos na tumorigénese como proliferação, diferenciação, migração, entre outros. Ainda neste gene, não se deverá excluir a existência de grandes deleções, uma vez que em algumas amostras se detectaram todos os polimorfismos em homozigotia. Será contudo necessário complementar este estudo com a análise do número de cópias do gene nas mesmas amostras. No caso do gene *BMPRIA*, uma das mutações deverá ser muito provavelmente patogénica, visto ser uma mutação do sítio dador de *splicing* e originar um transcrito aberrante. Em relação às restantes duas, são necessários estudos adicionais ao nível do RNA, uma vez que poderão afectar também o *splicing*. A confirmar-se a patogenicidade destas três mutações, as mutações no gene *BMPRIA* deverão continuar a associar-se principalmente à polipose juvenil, uma vez que estas foram detectadas nos dois doentes que apresentavam polipose juvenil, e apenas em 1 dos doze doentes com polipose serreada.

Relativamente ao envolvimento do *MGMT* na tumorigénese associada à PS, este não é conclusivo em relação a um envolvimento germinal, uma vez que a análise de

mutações germinais ainda não se encontra terminada. No entanto, para além da metilação do gene, identificada num estudo anterior do Grupo de Gastreenterologia da UIPM, IPOLFG, E.P.E., na vasta maioria das lesões de PS (inclusive em lesões precoces como os pólipos hiperplásicos), pode-se concluir que a LOH deste gene também é um evento inicial na tumorigénese associada à PS. Assim, pode-se concluir que alterações (epi)genéticas neste gene contribuem largamente para a iniciação tumoral no contexto de PS. No entanto, será necessária a análise de mais marcadores e de um maior número de lesões para confirmar a sua quase exclusiva associação às formas de PS, com localização preferencial das lesões no cólon proximal ou em todo o cólon.

7. Referências Bibliográficas

- Adzhubei, I. , et al. (2010) "A method and server for predicting damaging missense mutations", *Nat Methods*, **7**(4), pp. 248–9.
- Ahn, H. S., et al. (2012) "Hyperplastic Polyposis Syndrome Identified with a BRAF Mutation", *Gut Liver*, **6**(2), pp. 280–283.
- Albuquerque, C., et al. (2010) "Colorectal cancers show distinct mutational spectra in members of the canonical WNT signaling pathway according to their anatomical localization and type of genetic instability", *Genes Chromosomes Cancer*, **49**(8), pp. 746–759.
- Albuquerque, C., et al. (2011) "Colorectal cancers choosing sides", *Biochim. Biophys. Acta*, **1816**(2), pp. 219–231
- Armaghany, T., et al. (2012) "Genetic alterations in colorectal cancer", *Gastrointest. Cancer Res.*, **5**(1), pp. 19–27.
- Bock, C., et al. (2006) "CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure", *PLoS Genet.*, **2**(3), pp. 26.
- Boland, C. R., e Goel, A. (2010) "Microsatellite instability in colorectal cancer", *Gastroenterol.*, **138**(6), 2073–2087, pp. 3.
- Boparai KS, et al. (2010) "Increased colorectal cancer risk in first-degree relatives of patients with hyperplastic polyposis syndrome", *Gut*, **59**(9), pp. 1222–5.
- Brosens, L. A., et al. (2011) "Juvenile polyposis syndrome", *World J. Gastroenterol.*, **17**(44), pp. 4839–44.
- Callahan N, et al. (2010) "Axis Inhibition Protein 2 (AXIN2) Polymorphisms and Tooth Agenesis", *Arch. of oral biol.*, **54**(1), pp. 45–49.
- Centelles, J. J. (2012) "General aspects of colorectal cancer", *ISRN Oncol.*, **2012**, pp. 139268.

- Cheah PY, et al. (2009) "Germline bone morphogenesis protein receptor 1A mutation causes colorectal tumorigenesis in hereditary mixed polyposis syndrome", *Am J Gastroenterol.*, **104**(12), pp. 3027–33.
- Desmet, F., e Hamroun, D. (2009) "Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals", *Nuc Ac Res*, **39**(9), pp. 1–14.
- Fearon, E. e Vogelstein, B. (1990) "A genetic model for colorectal tumorigenesis", *Cell*, **61**(5), pp. 759–767.
- Ferlay, J., et al. (2010) "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008", *Int. J. Cancer*, **127**(12), pp. 2893–917.
- Gonzalez, C. (2007) "Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence", *Br. J. Nutr.*, **96**(1), pp. 42–45.
- Guarinos, C., et al. (2012) "Serrated polyposis syndrome: Molecular, pathological and clinical aspects", *World J. Gastroenterol.*, **18**(20), pp. 2452–61.
- Gunes, G., e Pinarbasi, H. (2010) "AXIN2 polymorphism and its association with astrocytoma in a Turkish population", *Mol Med Report*, **3**, pp. 705–709.
- Halford, S., et al. (2005) "O(6)-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions", *Gut*, **54**(6), pp. 797–802.
- Jasperson, K. W., et al. (2010) "Hereditary and familial colon cancer", *Gastroenterol.*, **138**(6), pp. 2044–58.
- Jass, J. R. (2006) "Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term", *WJG*, **12**(31), pp. 4943–50.
- Jemal, A., et al. (2011) "Global Cancer Statistics", *CA Cancer J Clin*, **61**(2), pp. 69–90.
- Jho, E., et al. (2002) "Wnt / β -Catenin / Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway", *Mol Cell Biol.*, **22**(4), pp. 1172–1183.

- Jiao J, et al. (2012) "Occupational solvent exposure, genetic variation of DNA repair genes, and the risk of non-Hodgkin's lymphoma". *Eur J Cancer Prev.*, **21**(6), pp. 580–584.
- Kambara, T., et al. (2004) "BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum", *Gut*, **53**(8), pp. 1137–44.
- Kamocki, Z., et al. (2012) "Hereditary mixed polyposis syndrome-own experience". *Pol Przegl Chir*, **84**(5), pp. 262–6.
- Kim, M. S., et al. (2009) "Frameshift mutations of Wnt pathway genes AXIN2 and TCF7L2 in gastric carcinomas with high microsatellite instability", *Hum. Pathol.*, **40**(1), pp. 58–64.
- Kodach, L. L., et al. (2008) "The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer", *Cancer*, **112**(2), pp. 300–6.
- Kumar, P., et al. (2009) "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm", *Nat Protoc*, **4**(7), pp. 1073–81.
- Lage, P., et al. (2004) "Management of Portuguese patients with hyperplastic polyposis and screening of at-risk first-degree relatives: a contribution for future guidelines based on a clinical study", *Am J Gastroenterol.*, **99**(9), pp. 1779–1784.
- Lammi, L., et al. (2004) "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer", *Am. J. Hum. Genet.*, **74**(5), pp. 1043–50.
- Leggett, B., e Whitehall, V. (2010) "Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis", *Gastroenterol.*, **138**(6), pp. 2088–100.
- Lindor, N. M. (2009) "Hereditary colorectal cancer: MYH-associated polyposis and other newly identified disorders", *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **23**(1), pp. 75–87.

- Lindor, N., et al. (2005) "Lower cancer incidence in amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency familial colorectal cancer type X", *JAMA*, **293**(16), pp. 1979–85.
- Logan, C. Y., e Nusse, R. (2004) "The Wnt signaling pathway in development and disease", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, pp. 781–810.
- Lorente-Trigos, A., et al. (2010) "BMP signaling promotes the growth of primary human colon carcinomas in vivo", *J Mol Cell Biol*, **2**(6), pp. 318–32.
- Lynch, H. T., et al. (2006) "Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications", *Eur J Med Genet*, **14**(4), pp. 390–402.
- McLaren, W., et al. (2010) "Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor", *Bioinformatics*, **26**(16), pp. 2069–70.
- Moghaddam, A. A., et al. (2007) "Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **16**(12), pp. 2533–47.
- NCBI - *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*; Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nieminen TT, et al. (2011) "BMPRI1A mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency", *Gastroenterol.*, **141**(1), pp. 23–6.
- Noffsinger, A. E. (2009) "Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy", *Annu Rev Pathol*, **4**, pp. 343–64.
- Osakada, F. et al. (2007) "WNT signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals", *J Neurosci.*, **27**(5), pp. 4210-9
- Perotti, C., et al. (2012) "The bone morphogenetic protein receptor-1A pathway is required for lactogenic differentiation of mammary epithelial cells in vitro", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **48**(6), pp. 377–84.

- Pinarbasi, H. (2009) "Strong association between lung cancer and the AXIN2 polymorphism", *Mol Med Report*, **2**, pp. 1029–1035.
- Pino, M. S., e Chung, D. C. (2010), "The chromosomal instability pathway in colon cancer", *Gastroenterol.*, **138**(6), pp. 2059–72.
- Potter, J. D. (1999) "Colorectal cancer: molecules and populations", *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**(11), pp. 916–32.
- Rashid A., et al. (2000) "Phenotypic and Molecular Characteristics of Hyperplastic Polyposis", *Gastroenterol.*, **119**(2), pp. 323–332.
- Ratcliffe, M. J., et al. (2000) "A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction", *J Biol Chem.*, **275**(46), pp. 35680–3.
- Rosty, C., et al. (2011) "Serrated polyposis: an enigmatic model of colorectal cancer predisposition", *Patholog Res Int.*, **2011**, pp. 157073.
- Shen, J., et al. (2005) "MGMT genotype modulates the associations between cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk", *Carcinogenesis*, **26**(12), pp. 2131–7.
- Silber JR, et al. (2012) "O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems", *Biochim Biophys Acta.*, **1826**, pp. 71–82.
- Silva, P., et al. " Serrated polyposis with family history of polyps and/or colorectal cancer: a distinct clinical and molecular entity differing between the proximal and the distal colon", submetido para publicação.
- Smith, P. J., et al. (2006) "An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers". *Hum. Mol. Genet.*, **15**(16), pp. 2490–508.
- Snover, D. C. (2011) "Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma", *Hum. Pathol.*, **42**(1), pp. 1–10.

- Snover, D. C., et al. (2005) "Serrated Polyps of the Large Intestine: A Morphologic and Molecular Review of an Evolving Concept", *Am. J. Clin. Pathol.*, **124**(3), pp. 380–391.
- Sugumar, A., e Sinicrope, F. a. (2010) "Serrated polyps of the colon", *F1000 Med Rep*, **2**(12), pp. 89.
- Torlakovic, E., e Snover, D. C. (1996) "Serrated adenomatous polyposis in humans", *Gastroenterol.*, **110**(3), pp. 748–55.
- Umar, A., et al. (2004) "Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer", *Nat Rev Cancer*, **4**(2), pp. 153–8.
- Vandrovcova, J., et al. (2006) "Somatic BRAF-V600E mutations in familial colorectal cancer", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**(11), pp. 2270–3.
- Venkatachalam, R., et al. (2010) "The epigenetics of (hereditary) colorectal cancer", *Cancer Genet. Cytogenet.*, **203**(1), pp. 1–6.
- Wang, X., et al. (2008) "Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **17**(8), pp. 2101–8.
- Win, A. K., et al. (2012) "Cancer risks for relatives of patients with serrated polyposis", *Am J Gastroenterol.*, **107**(5), pp. 770–8.
- World Health Organization (2012). *Media centre*, Recuperado em Agosto de 2012, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
- Yavropoulou, M. P., e Yovos, J. G. (2007) "The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation", *Hormones*, **6**(4), pp. 279–94.
- Young, J., e Jass, J. R. (2006) "The case for a genetic predisposition to serrated neoplasia in the colorectum: hypothesis and review of the literature", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**(10), pp. 1778–84.
- Zambirinis, C. P., et al. (2009) "Undefined familial colorectal cancer", *World J Gastrointest Oncol*, **1**(1), pp. 12–20.

8. Anexos

Anexo 1 – Tabela com características clínicas dos doentes com PS.

Família	Identificação da Amostra	Idade de diagnóstico em anos	Sexo	Número total de lesões	Tipo de lesões ^a	Localização preferencial das lesões ^b	CCR	Número de indivíduos afectados na família	História familiar ^c (idade de diagnóstico em anos)
PS - HF/CCR									
PH1	A187/A756	62	M	>100	PH +ATDBG+ASTDBG+ASS	Todo o cólon [†]	Não	3	Filho - > 45 pólipos SE (42) ; filho – 2 pólipos SE (37)
PH3	A755	41	F	>100	PH + ASTDBG +ATVDBG+ASS+ATDBG	Todo o cólon [†]	Não	3	Mãe - CCR (67); tia materna - CCR (58)
PH4	CA638S	66	M	19	AST (DBG+DAG) +AV	Todo o cólon	Sim*	5	Irmão gémeo - 20 pólipos AD e SE (70); filho - 2 pólipos AD (37); sobrinho - 18 pólipos AD (54)
	A360/CA636	69	M	50	PH + ATDBG+ASTDBG+ ATVDBG [‡]	Proximal	Sim*		
PH5	A193	69	F	40	PH +ATDBG+ATVDAG	Proximal	Sim	3	Irmã – 2 pólipos AD (67); filho - 1 pólio SE (52)
PH6	A462/A478	64	M	50-100	PH + ASTDBG + ATDBG+ASS	Distal [†]	Não	5	Pai - CCR (57); irmã - 7 pólipos (61); filha - 1 pólio SE (39); filho - 2 pólipos AD (35)
PH7	A468/A759	50	M	50-100	PH +AT	Todo o cólon	Sim	3	Mãe - 2 pólipos AD (75); irmão - 8 pólipos SE e AD (47)
PH8	A643/A760	59	F	45	PH +ASS+ASTDBG	Proximal	Não	4	Avô materno - CCR; mãe - CCR (73); irmã - 3 pólipos AD (61)
PH14	A686	80	M	49	PH +ASTDBG+ATDBG	Distal	Não	2	Filha - 11 pólipos SE e 1 AD (42)
PH33	A983	49	M	45	PH + ASTDBG + ATDBG+ASS	Distal	Não	4	Tio paterno - pólipos (69); pai - 1 pólio AD (77); irmão - 1 pólio AD (50)
PS esporádica									
PH9	A500	48	F	40	PH +ASS+ASTDBG	Todo o cólon	Não	1	- [‡]
PH11	A757	53	M	50	PH + AST	Distal	Sim*	1	- [‡]

PS – polipose serrada; HF – história familiar; CCR – cancro do cólon e recto; M – masculino; F – feminino; PH – pólio hiperplásico; ATDBG – adenoma tubular com displasia de baixo grau; ASTDBG – adenoma serrado tradicional com displasia de baixo grau; ASS – adenoma serrado séssil; ATVDBG – adenoma tubuloviloso com displasia de baixo grau; AST – adenoma serrado tradicional; DBG – displasia de baixo grau; DAG – displasia de alto grau; AV – adenoma viloso; ATVDAG – adenoma tubuloviloso de alto grau; AT – adenoma tubular; SE – pólio serrado; AD – adenoma tradicional; * - CA/S (carcinoma adenomatoso/serrado); ‡ - com áreas de AST; † - sem evidências de PS e/ou pólipos/CCR em familiares de 1º grau de doentes com PS esporádica, tanto por análise por colonoscopia como por ausência de sintomas.

^a – O(s) tipo(s) de lesão(s) que são prevalentes (≥70%) em cada doente é indicado a negrito.

^b – Considera-se uma localização preferencial das lesões como proximal ou distal, quando pelo menos 70% das lesões se encontram localizadas no cólon proximal ou distal, respectivamente.

^c – todas as famílias demonstram um padrão de hereditariedade dominante.

Anexo 2 - Protocolo de extração de RNA a partir de sangue periférico com Trizol[®].

1. Numerar um tubo de 50ml para cada caso;
2. Colocar o sangue de 3 tubos de hemograma, correspondentes a cada caso, no respectivo tubo;
3. Adicionar *RBC* até se perfazerem 45ml, e agitar;
4. Colocar os tubos em gelo durante 30 minutos;
5. Centrifugar durante 10 minutos a 1200rpm;
6. Descartar o sobrenadante para um recipiente com lixívia;
7. Ressuspender o *pellet*;
8. Adicionar PBS 1x até se perfazerem 45ml;
9. Centrifugar durante 10 minutos a 1200rpm;
10. Numerar dois tubos tipo *eppendorf* de 1,5ml para cada caso;
11. Descartar o sobrenadante para um recipiente com lixívia;
12. Ressuspender o *pellet*;
13. Adicionar 2ml de PBS 1x a cada tubo e homogeneizar;
14. Distribuir 1ml dessa solução por cada um dos tubos tipo *eppendorf* de 1,5ml;
15. Realizar uma centrifugação curta a 5000rpm;
16. Descartar o sobrenadante para um recipiente com lixívia;
17. Adicionar 1ml de *Trizol* a cada tubo;
18. Guardar os tubos com RNA em *Trizol* a -80°C (até ser necessário extrair o RNA).

Descongelar a temperatura ambiente.

19. Juntar 0,2 ml de clorofórmio a cada tubo;
20. Agitar fortemente por 20 segundos (manualmente);
21. Deixar repousar à temperatura ambiente entre 2 a 3 minutos;
22. Centrifugar a 4°C a 14000rpm por 20 minutos;
23. Transferir para novo tubo a fase aquosa (superior);
24. Juntar 500µl de isopropanol a cada tubo e deixar a -20°C *overnight*;
25. Centrifugar a 4°C a 14000rpm por 20 minutos;
26. Desprezar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 1ml de etanol a 75% gelado (preparado com DEPC);
27. Vortexar;
28. Centrifugar 5 minutos a 8000rpm a 4°C;

29. Desprezar sobrenadante e secar o *pellet* ao ar;
30. Ressuspender cada *pellet* em 20µl de água com DEPC;
31. Em espectrofotômetro, quantificar o RNA extraído;
32. Em gel de agarose 0,8% feito com TBE 1x, verificar a integridade do RNA extraído;
33. Armazenar a -80°C.

Anexo 3 - Sequências e características dos *primers* desenhados para os genes em estudo.

AXIN2

Exão	Sequência	%GC	Tamanho do fragmento
Ex1A F	GGGTTTTTGGGAAGGTTGTG	47%	727pb
Ex1A R	AACAGGTAAGCACCGTCTTG	50%	
Ex1B F	CATCTCCGGATTCCCCTCT	58%	684pb
Ex1B R	TCCACCCATCCACCATACTT	50%	
Ex2 F	GCTGCCTCTGGAATACTCTCTG	55%	465pb
Ex2 R	TAAGTGCTCAGGTGGCATCC	55%	
Ex3 F	AGCACCGATGGTATCTGGAG	55%	274pb
Ex3 R	CCACCACCCATTTCTTTTCTT	43%	
Ex4 F	GATGGTTGACAACAGTCTTTGAAG	42%	549pb
Ex4 R	CTAACGCACCCCATGCAC	62%	
Ex5 F	CTTCTGCTTCCTGGGTCACT	55%	673pb
Ex5 R	CTGCCGCCCTCTTAGAACT	55%	
Ex6 F	AGGAGTCCCGGAGATTTAACC	52%	330pb
Ex6 R	AACAGCCATTCCCACAATACC	48%	
Ex7 F	TTCCAGTTCTTCTAACCCAGTTTC	41%	398pb
Ex7 R	TTGAGACCCAGGCAGAAAGAG	52%	
Ex8 F	AATTGCTCTGGGGACAACAG	50%	320pb
Ex8 R	GGACATGGATGGCAACATCT	50%	
Ex9 F	GCACGTGTGTGTTTGCTTTAG	48%	300pb
Ex9 R	TCTGGCTCTTGTTCTGAGC	55%	
Ex10A F	CAACAATGTGGAAAATGCAG	40%	684pb
Ex10A R	AAGAAACCATGAACGCACTC	45%	
Ex10B F	ACTTGGAAGGGGGAGACAG	58%	640pb
Ex10B R	GTAACAATGGCAAACAGAATG	38%	
Ex10C F	ACCTTTCCTCCACACACCT	53%	506pb
Ex10C R	TCAAGCACAGATGTCTACACAC	45%	

BMPRI4

Exão	Sequência	%GC	Tamanho do fragmento
Ex1 F	GGCATTGTGTTCCCTTTTAG	40%	369pb
Ex1 R	AAGAACAGAAGCAAGAAATAGTG	40%	
Ex2 F	GCTTAACAACCTTTTCTCATTG	32%	574pb
Ex2 R	TTTTGGTAACCTCTAAGTTTTC	32%	
Ex3 F	CCTGTTTCACATTCAGACTCA	45%	274pb
Ex3 R	TACACCAGGCATGTTTCTC	47%	
Ex4/5 F	TCACTCACTGAAATAGAAATTG	32%	547pb
Ex4/5 R	AGGAGATATACAACCAGAGAATAC	38%	
Ex6 F	TTCTGAGGGAAGGATAATGG	45%	299pb
Ex6 R	GAGGACACATTCTAAATCAACAC	39%	
Ex7 F	TGAGATGGACTACCCCTTTG	50%	327pb
Ex7 R	CCTGTACCTCACTAGCCTTG	55%	
Ex8 F	CCTAAGTTTTTCTCAGTATCCAG	39%	524pb
Ex8 R	CCCCCAACTATACATTTATG	40%	
Ex9 F	AATGCTAAATTCCACAATGC	35%	454pb
Ex9 R	TCCTTATCCAATAATATATACACC	29%	
Ex10 F	CGTTTTAGTTCCATAGTTTAGC	36%	280pb
Ex10 R	TATATTTGGTGGCATTACG	35%	
cDNA F	TTACAAGAAAATCTCACTGAATG	30%	2138pb
Ex11N1 R	CAAAGGTAGAATACAAACGAAC	36%	

MGMT

Exão	Sequência	%GC	Tamanho do fragmento
Ex2-F	GTAGTATTGGTTGGCTGCTC	50%	479pb
Ex2-R	GACTCGTGGTTGCGGTTG	61%	
Ex3-F	GTTTGCTTTTCCGATGTGTG	45%	448 pb
Ex3-R	TCATTTTTATTGCCTTTGCC	35%	
Ex4-F	TGCGTTTCCTGTTTTGGG	50%	384pb
Ex4-R	GCATCTGGCATAATGGTCC	53%	
Ex5B-F	CAGTGTCTGGAACAAGCG	60%	563pb
Ex5B-R	CGAACCCGTGTCCAGAGAGC	65%	

Anexo 4 – Condições utilizadas na amplificação por PCR dos genes em estudo.

AXIN2

Exão	Temperatura (°C)	[MgCl ₂] (mM)	[<i>primer</i>] (pmol/μl)	Ciclos
1A	64	4	0,12	32
1B	63	3	0,12	32
2	67	3	0,12	35
3	64	5	0,12	30
4	65	4	0,12	32
5	67	3	0,12	32
6	64,5	3	0,12	35
7	65	5	0,12	32
8	66	4	0,12	32
9	66	3	0,12	32
10A	59	4	0,12	35
10B	64	7	0,12	32
10C	59	3	0,12	32

BMPRIA

Exão	Temperatura (°C)	[MgCl ₂] (mM)	[<i>primer</i>] (pmol/μl)	Ciclos
1	60	3	0,12	35
2	51,5	3	0,12	35
3	58	2	0,12	35
4/5	62	4	0,12	35
6	58	4	0,12	35
7	63	7	0,12	35
8	61,5	4	0,12	35
9	60	5	0,12	35
10	55	4	0,12	35

MGMT

Exão	Temperatura (°C)	[MgCl ₂] (mM)	[<i>primer</i>] (pmol/μl)	Ciclos
2	66	3	0,24	33
3	64	8	0,24	33
4	65,5	3	0,24	33
5B	70	5	0,24	30

Anexo 5 – Protocolos para preparação dos reagentes utilizados no controle da eficiência dos produtos de PCR.

Tampão de electroforese

TBE 1x: preparado a partir de 200ml de TBE 10x (0,89M Tris Borato pH 8.3 + 20mM Na₂ EDTA – *National Diagnostics*) para um volume final de 2000ml, em água bidestilada.

Gel de agarose 2% (p/v)

- 1) Pesar 5g de agarose (*Seakem[®] LE Agarose – Lonza*), para um erlenmeyer de 400ml;
- 2) Adicionar 250ml de tampão TBE 1x;
- 3) Dissolver no microondas durante 3 minutos na potência máxima, e deixar arrefecer um pouco;
- 4) Adicionar 12,5µl de brometo de etídeo (10mg/ml, *MP biomedical*s) e agitar até completa homogeneização;
- 5) Colocar a solução num molde com 4 pentes de poços e deixar arrefecer até ocorrer a solidificação do gel.

Gel de agarose 1% (p/v)

- 1) Pesar 1,5g de agarose (*Seakem[®] LE Agarose – Lonza*), para um erlenmeyer de 400ml;
- 2) Adicionar 150ml de tampão TBE 1x;
- 3) Dissolver no microondas durante 3 minutos na potência máxima, e deixar arrefecer um pouco;
- 4) Adicionar 7,5µl de brometo de etídeo (10mg/ml, *MP biomedical*s) e agitar até completa homogeneização;
- 5) Colocar a solução num molde com 1 pente de poços e deixar arrefecer até ocorrer a solidificação do gel.

Orange G (*Sigma*) 5x e 1x

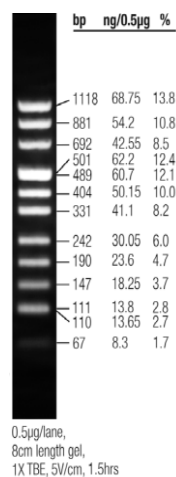
Orange G 5x: preparado a partir de 12ml de *Ficoll (Sigma)*, 125g de *Orange G (Sigma)* e perfazer o volume para 50ml, com água bidestilada.

Orange G 1x: preparado a partir de 400µl de *Orange G* 5x (*Sigma*) e adicionar 1ml de água bidestilada.

Preparação do *pUC Mix* marcador 8 (*Fermentas*)

Adicionar 50µl de *pUC Mix* marcador 8 (*Fermentas*) a 250µl de *Orange G* 5x e adicionar 700µl de água bidestilada.

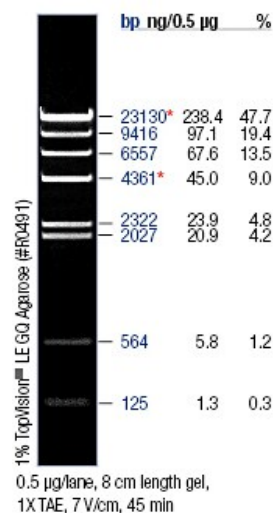
Marcador de peso molecular *pUC Mix* marcador 8 (*Fermentas*):



Preparação do marcador Lambda/HindIII (*Fermentas*)

Adicionar 50µl de marcador Lambda/HindIII (*Fermentas*) a 250µl de *Orange G* 5x e adicionar 700µl de água bidestilada.

Marcador Lambda/HindIII (*Fermentas*):



Anexo 6 - Condições utilizadas na amplificação por PCR do gene *BMPRIA*, a partir do cDNA.

Gene	Temperatura (°C)	[MgCl ₂] (mM)	[<i>primer</i>] (pmol/μl)	Ciclos
<i>BMPRIA</i>	55	3	0,24	40

Anexo 7 - Protocolo de purificação e extracção de DNA a partir de banda de gel de agarose – *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

- 1) Pesar um tubo tipo *eppendorf* de 1,5ml vazio;
- 2) Excisar a banda de interesse do gel de agarose, com uma lâmina de bisturi limpa e colocá-la dentro do tubo;
- 3) Pesar novamente o tubo de 1,5ml contendo a agarose;
- 4) Adicionar 3 volumes de tampão *QG* por cada volume de gel (100mg~100 µl)
- 5) Incubar a 50°C, durante 10min, misturando a cada 2-3minutos, para ajudar a dissolver a agarose;
- 6) Verificar se a mistura apresenta uma cor amarela. Caso não se verifique, adicionar 10µl de acetato de sódio 3M a pH 5.0.
- 7) Adicionar 1 volume de isopropanol e agitar em *vortex*;
- 8) Colocar uma coluna *QIAquick spin column* num tubo colector de 2ml;
- 9) Adicionar todo o volume, contido no tubo de 1,5ml à coluna e centrifugar a 13000rpm, durante 1min;
- 10) Descartar o volume contido no tubo colector e recolocar a coluna no mesmo;
- 11) Adicionar 500µl de tampão *QG* à coluna e centrifugar a 13000rpm, durante 1min;
- 12) Descartar o volume contido no tubo colector e recolocar a coluna no mesmo;
- 13) Adicionar 750µl de tampão *PE* à coluna e centrifugar a 13000rpm, durante 1min;
- 14) Descartar o volume do tubo colector e centrifugar novamente durante 1 min;
- 15) Colocar a coluna num novo tubo tipo *eppendorf* de 1,5ml;
- 16) Adicionar 30µl de tampão *EB* ao centro da membrana da coluna e incubar durante 1 min à temperatura ambiente;
- 17) Centrifugar durante 1min a 13000rpm, para eluir o produto purificado;
- 18) Armazenar o produto purificado a -20°C.

Anexo 8 – Protocolo de precipitação e purificação do DNA Etanol / EDTA / Acetato de sódio – *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* após a reacção de sequenciação.

- 1) Num tubo de 1,5ml, devidamente identificado adicionar 2µl de EDTA (125mM), 2µl de acetato de sódio (3M) e 50µl de etanol absoluto.
- 2) Adicionar o produto da reacção de sequenciação e agitar em *vórtex*;
- 3) Incubar durante 15min à temperatura ambiente;
- 4) Centrifugar a 14000rpm durante 30min a 4°C;
- 5) Retirar completamente o sobrenadante (até à última gota) com uma micropipeta;
- 6) Adicionar 100µl de etanol a 70%(v/v) e agitar ligeiramente em *vórtex*;
- 7) Centrifugar a 14000rpm durante 15min a 4°C;
- 8) Retirar completamente o sobrenadante (até à última gota);
- 9) Secar o *pellet* a 37°C durante 10min;
- 10) Guardar o *pellet* a 4°C.

Anexo 9 – Marcadores de microssatélites.

Localização dos marcadores de microssatélites

Marcador de microssatélites	UniSTS	Posição (pb)
D10S1676	29784	130 006 232
D10S1651	67348	132 692 559
D10S169	146880	132 521 626

Localização do *MGMT*: 131 265 454 pb

Características dos marcadores de microssatélites

Marcador de microssatélites	Sequência (5' → 3')	% Heterozigotia	Tamanho (pb)
D10S1676	*Fwd: CCACCACTCAGAGGTAAGG Rev: AATTGTATGATCCCACTTTGTC	69%	156-168
D10S1651	*Fwd: TCGATTGACGCAAGTTT Rev: AGCACCCAGGGCTTCT	80%	166-200
D10S169	*Fwd: GATCTGTGACTGCCTTCCT Rev: AAGAGGAGGAGTCCATTGAG	73%	99-117

* - O *primer forward* encontra-se marcado com o fluorocromo FAM™ (6-Carboxifluorescein) – cor azul

Condições utilizadas na amplificação por PCR dos marcadores de microssatélites

Marcador de microssatélites	Temperatura (°C)	[MgCl ₂] (mM)	[<i>primer</i>] (pmol/μl)	Ciclos
D10S1676	58	6	0,24	40
D10S1651	61	4	0,2	40
D10S169	59	4	0,16	40

Anexo 10 – Resultados da pesquisa de mutações germinais nos exões e respectivas regiões flanqueadoras do gene *AXIN2*.

Amostra	Exão 1		Exão 2	Exão 3	Exão 4*	Exão 5	Exão 6	Exão 7	Exão 8	Exão 9	Exão 10		
	Frag. 1A	Frag. 1B									Frag. 10A	Frag. 10B	Frag. 10C
A187	NA	NA	N	N	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	NA	NA
A755	Het. 1 Het. 2	N	N	N	Het. 1 Het. 2	Hom. 1 Het. 2 Het. 3	N	N	N	N	N	N	Het. 1
CA638	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	N	Hom. 1
A360	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	N	Hom. 1
A193	Het. 1 Het. 2	N	N	N	Het. 1 Het. 2	Hom. 1 Het. 2 Het. 3	N	N	N	N	N	N	Het. 1
A468	Het. 1 Het. 2	N	N	N	N	Hom. 1 Hom. 2	c.1889 G>A	N	N	N	N	Hom. 1	Hom. 1
A643	Het. 1	N	N	N	Het. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	Het. 1	Hom. 1
A462	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	N	Hom. 1
A686	N	N	N	N	N	Het. 1	N	c.2013_2024del12	N	N	N	N	N
A500	Hom. 1 Het. 2	N	N	N	Het. 1	Het. 1 Het. 2	N	N	N	N	N	N	Het. 1
A757	Het. 1 Het. 2	N	N	N	Het. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	Het. 1	Hom. 1
A983	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	Hom. 1	Hom. 1 Hom. 2	N	N	N	N	N	N	Hom. 1

N – Normal (sem alteração); Het. – Heterozigótico; Hom. – Homozigótico; NA – não amplificado; **Exão 1A:** (1) c.1-409 G>C; (2) c.148 C>T (P50S); **Exão 4:** (1) c.1060-77 G>T; (2) c.1060-17

C>T; **Exão 5:** (1) c.1365 A>G (P455P); (2) c.1386 C>T (P462P); (3) c.1712+19 G>T; **Exão 10-Fragmento 10B:** (1) c.*794 C>A; **Exão 10-Fragmento 10C:** (1) c.*1012 T>A

*Todas as amostras do exão 4, e respectivas regiões flanqueadoras, possuem as seguintes alterações, todas em homozigotia: c.1060-254 A>G; c.1060-282 A>G; c.1060-287 A>G

Anexo 11 – Características clínicas dos familiares dos *proband* analisados.

Família	Proband	Identificação do familiar	Grau de parentesco	Idade em que se realizou a última colonoscopia	Tipo de lesões e idade de diagnóstico
PH4	CA638S	A1479	Irmão gémeo	78	20 pólipos AD e SE (70)
		A1508	Filha	42	-
		A1600	Sobrinha	51	-
		A1601	Sobrinha	65*	-
PH6	A462/A478	A1681	Filho	42	2 pólipos AD (35)
PH7	A468/A759	A1510	Irmão	56	8 pólipos SE e AD (47)
PH14	A686	A1095	Filha	46	11 pólipos SE e 1 AD (42)
		A1331	Filha	49	-
PH33	A983	A1480	Irmão	55	1 pólipos AD (50)

AD – adenoma tradicional; SE – pólipos serrados. *idade actual, não realizou colonoscopia.

Anexo 12 – Resultados da pesquisa de mutações germinais no gene *BMPRIA* (exceptuando o exão 11).

Amostra	Exão 1	Exão 2	Exão 3	Exão 4/5	Exão 6	Exão 7	Exão 8	Exão 9	Exão 10
A187	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A755	Het. 1	N	N	N	N	N	N	N	Het. 1
CA638	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A360	Het. 1	N	N	N	N	N	N	N	Het. 1
A193	Het. 1	N	N	N	N	N	N	N	Het. 1
A468	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A643	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A462	Het. 1	N	N	N	N	N	N	N	Het. 1
A686	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A500	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A757	N	N	N	N	N	c.676-6 A>C	N	N	N
A1491*	Het. 1	N	N	c.431-26 T>A	N	N	N	N	Het. 1
A1548*	N	N	N	c.430+1 G>A	N	N	N	N	N
A1612 ^s	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N – Normal (sem alteração); Het. – Heterozigotia; Hom. – Homozigotia; **Exão 1:** (1) c.4 C>A (P2T); **Exão 10:** (1) c.1343-11 T>C; *amostras de doentes com polipose juvenil; ^s amostra de doente com polipose serreada e 5 carcinomas síncronos.

Anexo 13 – Resultados da pesquisa de mutações germinais no gene *MGMT* (exceptuando os exões 1 e 5A).

Amostra	Exão 2	Exão 3	Exão 4	Exão 5B
A187	NA	NA	NA	NA
A755	N	N	N	N
CA638	N	Het. 1 Het. 2	N	N
A360	N	Het. 1 Het. 2	N	NA
A193	N	Het. 1 Het. 2	N	N
A468	N	N	N	N
A643	N	N	N	N
A462	N	N	N	N
A686	N	N	N	N
A500	N	N	N	N
A757	N	Het. 1 Het. 2	N	N
A983	N	N	N	N

N – Normal (sem alteração); Het. – Heterozigotia; NA – não amplificado; **Exão 3:** (1) c.252 C>T (L84L); (2) c.343 C>T (L115F).